

HÄMOGLOBINE ADULTER VÖGEL

Die Primärstruktur der Globinketten des
Feldsperlings (*Passer montanus*) und
Charakterisierung der Hämoglobine des
Araukanerhuhns (*Gallus gallus*, forma
araucana) und des Bankivahuhns
(*Gallus gallus*)

Dirk Schneegans

Ess
Minder
1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554811_0048

Aus dem
Max-Planck-Institut für Biochemie
in Martinsried bei München
Abteilung Proteinchemie
Direktor: Prof. Dr. G. Braunitzer

und dem

Institut für Geflügelkrankheiten
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. J. Kösters

H Ä M O G L O B I N E A D U L T E R V Ö G E L

Die Primärstruktur der Globinketten des
Feldsperlings (*Passer montanus*)
und
Charakterisierung der Hämoglobine des
Araukanerhuhns (*Gallus gallus*, forma *araucana*)
und des Bankivahuhns (*Gallus gallus*)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Dirk Schneegans
aus
Bad Dürkheim

München 1985

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl

Referent: Prof. Dr. J. Kösters

Korreferent: Prof. Dr. J. Boessneck

Tag der Promotion: 26. Juli 1985

Meinen Eltern

Abkürzungen

ATP = Adenosintriphosphat
CCl₄ = Tetrachlorkohlenstoff
CM- = Carboxymethyl-
DC- = Dünnschichtchromatographie
DNA = Desoxyribonukleinsäure
DPG = 2,3-Bisphosphoglycerat
GTP = Guanosintriphosphat
Hb = Hämoglobin
Hp = Hydrolytisches Peptid
HPLC = Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
IHP = Inositol-1,2,3,4,5,6-hexaphosphat
IPP = Inositol-1,3,4,5,6-pentaphosphat
ITP = Inositol-1,3,5-triphosphat
p50 = Sauerstoffpartialdruck bei Halbsättigung des Hämoglobins
pO₂ = Sauerstoffpartialdruck
Propin = 3-Diethylaminopropin
PTH = Phenylthiohydantoin
Quadrol = N,N,N',N'- Tetrakis(2-hydroxypropyl)ethyldiamin
Reagenz I = 1-(Isothiocyanato)benzol-4-sulfonsäure,
Natriumsalz
Reagenz IV = 7-(Isothiocyanato)naphtalin-1,2,5-trisulfon-
säure, Trinatriumsalz
RP = Umkehrphase
TEMED = N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin
TFA = Trifluoressigsäure
Tp = Tryptisches Peptid
TPCK = (N-Tosyl-L-phenylalanil)chloromethan
Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UMP = Umdrehung pro Minute

Ala = Alanin
 Arg = Arginin
 Asn = Asparagin
 Asp = Asparaginsäure
 Asx = Asn oder Asp
 Cys = Cystein
 Gln = Glutamin
 Glu = Glutaminsäure
 Glx = Gln oder Glu
 Gly = Glycin
 His = Histidin
 Ile = Isoleucin
 Leu = Leucin
 Lys = Lysin
 Met = Methionin
 Phe = Phenylalanin
 Pro = Prolin
 Ser = Serin
 Thr = Threonin
 Trp = Tryptophan
 Tyr = Tyrosin
 Val = Valin

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
I. E I N L E I T U N G	1
II. S C H R I F T T U M	2
Geschichte	2
Das Hämoglobinmolekül	3
Strukturen des Hämoglobins	4
Funktion der Aminosäuren	6
Funktion des Hämoglobins	9
Homologie	11
Phylogenese	12
Genetik	14
Globingene der Vögel	16
Sequenzermittlung	18
III. M A T E R I A L U N D M E T H O D E N	21
1. Gewinnung des Blutes, Hämolysen, Hämapspaltung	21
1.1 Feldsperling (Passer montanus)	21
1.1.1 Gewinnung des Blutes	21
1.1.2 Hämolysen	21
1.1.3 Hämapspaltung	21
1.2 Araukanerhuhn (Gallus gallus, forma araucana)	22
1.2.1 Gewinnung des Blutes	22
1.2.2 Hämolysen	22
1.2.3 Hämapspaltung	22

	Seite
1.3 Bankivahuhn (Gallus gallus)	22
1.3.1 Gewinnung des Blutes	22
1.3.2 Hämolyse	22
1.3.3 Hämabspaltung	22
2. Kettentrennungen	23
2.1 Feldsperling	23
2.1.1 Kettentrennung an CM 52 Cellulose	23
2.2 Araukanerhuhn	24
2.2.1 Kettentrennung an CM 52 Cellulose	24
3. Elektrophoresen	25
3.1 Gelelektrophorese	25
3.1.1 DISK-Gelelektrophorese	25
3.1.2 Triton-Gelelektrophorese	25
3.2 Dünnschicht-Elektrophorese	26
4. Oxidation	27
5. Enzymatische und chemische Spaltungen	27
5.1 Feldsperling α^A - Ketten	27
5.1.1 Tryptische Spaltung	27
5.1.2 Säurehydrolytische Spaltung der Asp-Pro Bindung	28
5.2 Feldsperling α^D - Ketten	28
5.2.1 Tryptische Spaltung	28

	Seite
5.3 Feldsperling β -Ketten	28
5.3.1 Tryptische Spaltung	28
5.3.2 Hydrolytische Spaltung der Asp-Pro Bindung	28
5.4 Araukanerhuhn	29
5.4.1 Tryptische Spaltung der α^A - Ketten	29
5.4.2 Tryptische Spaltung der α^D - Ketten	29
6. Isolierung der Peptide	30
6.1 Gelfiltration	30
6.1.1 Gelfiltration tryptischer Peptide	30
6.1.2 Gelfiltration hydrolytischer Peptide	30
6.2 Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)	31
7. Analysen	32
8. Sequenz	32
IV. E R G E B N I S S E	34
Das Hämoglobin des Feldsperlings	34
9. Gewinnung und Aufarbeitung des Feldsperling- blutes	34
10. Kettentrennungen	35

	Seite
11. α^A - Ketten	38
11.1 Oxidation und tryptische Spaltung	38
11.2 Isolierung der Peptide (RP 2)	38
11.3 Isolierung von Peptiden (RP 18)	39
11.4 Säurehydrolytische Spaltung der Asp-Pro Bindung	41
11.5 Isolierung von Peptiden (Gelfiltration)	42
11.6 Schema der Isolierung der Peptide	43
12. α^D - Ketten	44
12.1 Oxidation und tryptische Spaltung	44
12.1.1 Isolierung der Peptide (RP 2)	44
12.2 Isolierung von Peptiden (Vydac RP 18)	45
13. β - Ketten	49
13.1 Oxidation und tryptische Spaltung	49
13.2 Isolierung der Peptide (RP 2)	49
13.3 Säurehydrolytische Spaltung der Asp-Pro Bindung	51
14. Sequenzanalyse	52
Hämoglobin des Araukanerhuhns	58
15. Blut- und Globingewinnung	58
15.1 Elektrophoresen	58
16. Kettentrennung	59
17. α^D - Ketten	61
17.1 Oxidation und tryptische Spaltung	61
17.2 Isolierung tryptischer Peptide	62
17.3 Säurehydrolytische Spaltung der Asp-Pro Bindung	63

	Seite
18. α^A - Ketten	65
18.1 Oxidation und tryptische Spaltung	65
18.2 Isolierung der Peptide	65
18.3 Analysen	67
Hämoglobin des Bankivahuhns	68
19. Blut- und Globingewinnung	68
19.1 Bestimmung der Hämoglobin- komponenten	68
19.2 Bestimmung der Globinketten	69
V. D I S K U S S I O N	70
Hämoglobin des Feldsperlings	70
Hämoglobine des Araukaner- und des Bankivahuhns	90
VI. Z U S A M M E N F A S S U N G	95
VII. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	98
Sequenztabellen	56 - 57
Bruttoformeln	53 - 55
"	63

I. EINLEITUNG

Durch die Entwicklung in der Forschung beginnen wir heute viele Phänomene der Physiologie, Medizin und Biologie auf molekularer Basis zu verstehen. Dabei leistet die Aufklärung von Proteinstrukturen einen wesentlichen Beitrag. Kaum ein anderes Protein wurde so eingehend untersucht wie der rote Blutfarbstoff, das Hämoglobin. Es enthält die prosthetische Gruppe, das Häm, und den Eiweißanteil, das Globin, die sich zu einer Funktionseinheit zusammenlagern. Das Häm ist bei allen Spezies identisch, Unterschiede bestehen in der Primärstruktur des Proteins. Das Hämoglobin eignet sich besonders für vergleichende Untersuchungen.

Von zahlreichen Spezies (Säugetern, Vögeln, Reptilien, Fischen) ist die Aminosäuresequenz des Hämoglobins bekannt (1).

Aus der Ordnung der Passeriformes, die 5/8 aller Vogelarten repräsentiert, wurde bisher nur der gemeine Star (*Sturnus vulgaris*) untersucht (2).

Um präzisere Aussagen machen zu können, wurde ein zweiter Vertreter dieser Ordnung, der Feldsperling (*Passer montanus*) ausgewählt.

In dieser Arbeit wird die Bestimmung der Aminosäuresequenz der Globinketten dargestellt.

Sie soll als Grundlage für vergleichende Untersuchungen der Atmung dienen. Ferner können die molekularen Aspekte zum Verständnis der stammesgeschichtlichen Entwicklung beitragen.

Ein weiterer Teil der Arbeit befaßt sich mit der Untersuchung des Hämoglobins von Bankiva- und Araukanerhuhn. Diese Hühnerformen unterscheiden sich in mehreren Merkmalen (3). Ein Vergleich der Primärstrukturen soll darüber Aufschluß geben, ob auch hier Unterschiede erkennbar sind.

II. SCHRIFTTUM

Geschichte

Die erste Primärstrukturaufklärung eines Proteins war die Bestimmung der kompletten Aminosäuresequenz des Insulins. Sie wurde von F. Sanger 1955 veröffentlicht (4).

Die Sequenz der insgesamt 574 Aminosäuren des Humanhämoglobins konnte zuerst von G. Braunitzer 1961 bestimmt werden (5).

Im Arbeitskreis von J. Kendrew gelang mit Hilfe der Röntgenbeugungsanalyse 1960 zum ersten Mal die Bestimmung der Raumstruktur eines Chromoproteids, des Myoglobins (6). Gleichzeitig wurde im Arbeitskreis von M.F. Perutz nach dem gleichen Verfahren die Raumstruktur des Hämoglobins ermittelt (7).

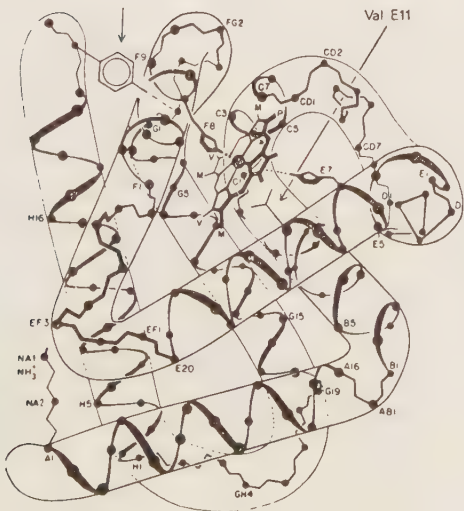
1967 beschrieben Edman und Begg die Konzeption eines Gerätes zur automatischen Sequenzanalyse von Peptiden und Proteinen (8).

Aus dieser Idee entwickelte die Firma Beckmann Instruments ein Gerät, das 1969 auf den Markt kam, den "Sequencer". G. Braunitzer gelingt damit die erste, vollautomatische, komplette Sequenzanalyse eines Proteins (9).

Das Hämoglobinmolekül

Das Hämoglobinmolekül der Vögel besteht aus 4 Polypeptidketten, je zwei identischen α - und β -Ketten. Die Aminosäuresequenz der α - und β -Ketten ist unterschiedlich. Die Ketten falten sich dennoch zu ähnlichen dreidimensionalen Strukturen. Jede Kette enthält das Häm, ein Ringsystem aus Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Stickstoffatomen, in dessen Mitte ein Eisenatom gebunden ist. Der Porphyrinring und das umgebende Protein geben dem Eisen seine Eigenschaft, Sauerstoff reversibel zu binden.

Abb: Raumstruktur einer Globin-Kette mit gebundenem Häm
Die Helixbereiche sind mit den Buchstaben A - H bezeichnet, vom Aminoende links unten beginnend. (10)



Strukturen des Hämoglobins

Die Ketten des Hämoglobins bestehen, wie alle Proteine, aus kleinen organischen Molekülen, den Aminosäuren, deren lineare Aufeinanderfolge man Primärstruktur nennt. In Proteinen findet man regelmäßig ca. 20 verschiedene Aminosäuren, die sich in der Art der Seitenketten unterscheiden.

Die β -Ketten des Hämoglobins bestehen aus 146-, die α -Ketten aus 141 Aminosäuren. Änderungen in der Primärstruktur beeinflussen die physiologischen Eigenschaften des Gesamtmoleküls.

Durch die Primärstruktur ist die räumliche Gestalt der Ketten festgelegt. Sie ergibt sich nicht zufällig, sondern als Konsequenz bindender Kräfte zwischen den Atomen der Kette selbst. Man spricht von der Sekundärstruktur. Die begünstigte Strukturform ist für Globinketten die α -Helix.

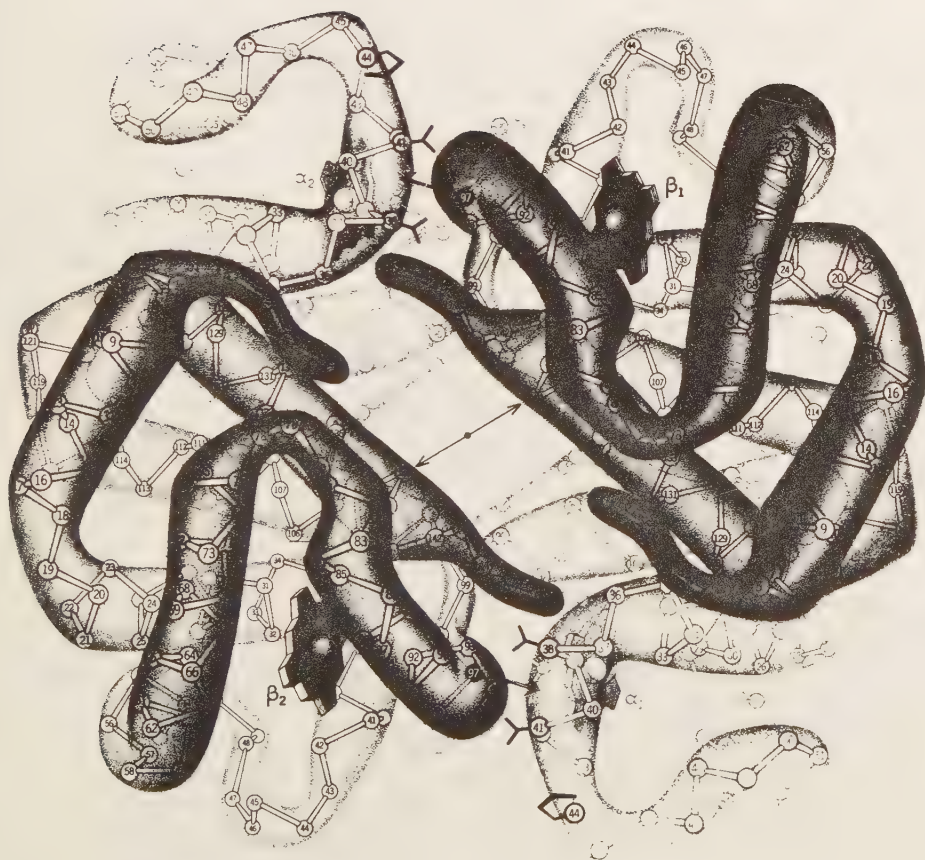
In dieser Helix stehen sich pro Windung 3,6 Aminosäurereste gegenüber. Dadurch haben die CO- und NH-Gruppen den passenden Abstand für die Wasserstoffbrückenbindungen. Da sich nicht alle Aminosäuren am Aufbau von Helices beteiligen, entstehen helikale und nichthelikale Segmente in den Ketten. Die α -Ketten enthalten 7, die β -Ketten 8 helikale Segmente (A - H).

Dazwischen liegen die nichthelikalen Segmente AB, BC... usw.

Die Ketten beginnen und enden mit den nichthelikalen Segmenten NA und HC. Durch die zwischengeschalteten Umkehrschleifen d.h. die nichthelikalen Bereiche, können sich die Helixabschnitte zu einem globulären Molekül ordnen, zur Tertiärstruktur. (siehe Abb. S.5)

Im Hämoglobinmolekül der Vögel sind vier Ketten miteinander verbunden und bilden so ein Tetramer, die Quartärstruktur.

Abb: Tertiärstruktur des Hämoglobinmoleküls (78)



Funktion der Aminosäuren

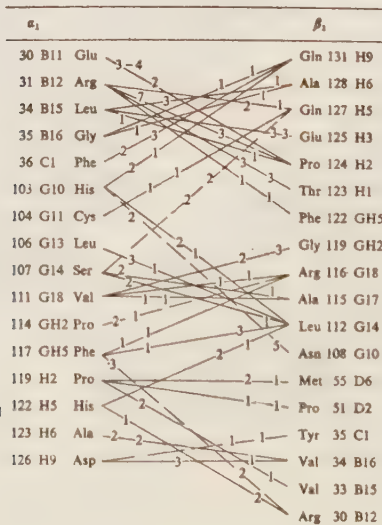
Die Aminosäuren haben bestimmte Funktionen, sowohl für den Aufbau, als auch für den Funktionsmechanismus des Moleküls.

Die Funktionen sind:

1. Die Bindung des Häms an die Ketten.
2. Die Bindungen zwischen α_1 - β_1 bzw α_2 - β_2 Ketten

Diese Kontakte bilden aus den 4 Ketten Untereinheiten zu jeweils zwei Ketten (Dimere). Diese Bindungen sind so stabil, daß sie auch bei der Reaktion des gesamten Moleküls mit Sauerstoff nur gering beeinflußt werden.

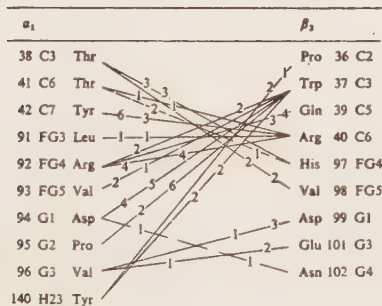
Abb: α_1 - β_1 Bindungsstellen von Human-Hämoglobin
 Positionsangabe in den Ketten
 Angabe der Helixbereiche. (11)



3. Die Bindungen zwischen $\alpha_1 - \beta_2$ bzw $\alpha_2 - \beta_1$ Ketten.

Diese Kontakte sind für die Funktion des Moleküls bedeutend. Sie verbinden die relativ starren Dimere miteinander, erlauben jedoch, daß sie verschiedene Stellungen zueinander einnehmen können. Jede der Stellungen wird durch andere Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Die Bindungen ermöglichen die Bewegung des Moleküls bei der Aufnahme und Abgabe des Sauerstoffs.

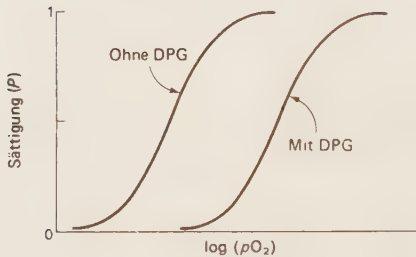
Abb: Bindungsstellen zwischen α_1 - und β_2 -Ketten von Human-Hämoglobin (Oxy-/Deoxyform). (11)



4. Bildung von Kontakten mit allosterischen Effektoren. (12)

Als Beispiel für allosterische Effektoren seien hier Polyphosphate genannt. Durch Anlagerung an bestimmte Aminosäuren setzen sie die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins herab, und erleichtern damit die Sauerstoffabgabe.

Abb: Einfluß von Phosphat (DPG) auf die O_2 -Affinität des Hämoglobins. Die Rechtsverschiebung der Bindungskurve bedeutet eine Erniedrigung der O_2 -Affinität. (13)



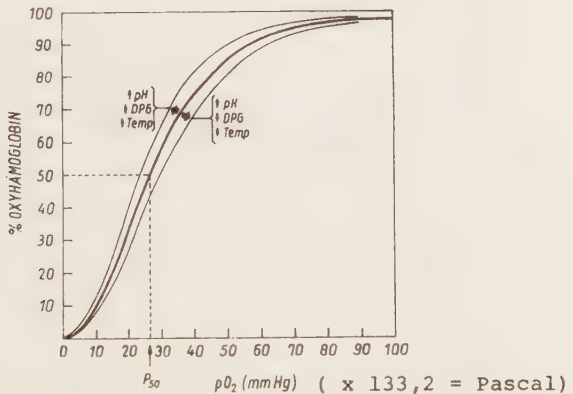
5. Aufnahme und Abgabe von Protonen (14).

Einige Aminosäuren sind in der Lage, bei Aufnahme von Sauerstoff Protonen abzugeben und bei Abgabe von Sauerstoff Protonen aufzunehmen. Die Aufnahme von Protonen stabilisiert die Deoxy-Form (T-Struktur) des Hämoglobins und begünstigt die Abgabe von Sauerstoff (Bohr-Effekt).

Funktion des Hämoglobins

Hämoglobin ist ein lebenswichtiges Protein. Es ist das sogenannte "respiratorische Protein" des Blutes. Es nimmt in der Lunge Sauerstoff auf und transportiert ihn im Blutkreislauf an den Ort des Verbrauchs, um ihn dort wieder abzugeben. Die Reversibilität der Sauerstoffbindung ist die entscheidende Eigenschaft des Hämoglobinmoleküls. Ein wichtiger Mechanismus der die Sauerstoffversorgung gewährleistet, ist die Regulation der Sauerstoffaffinität. Als Regulatoren wirken verschiedene Faktoren wie CO_2 , pH-Wert, organische Phosphate, Temperatur. (14)

Abb: Einfluß verschiedener Effektoren auf die Sauerstoffaffinität des Human-Hämoglobins. (15)



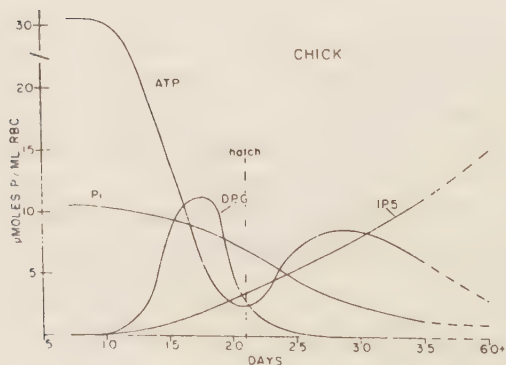
Da gerade bei den Phosphaten Unterschiede zwischen den verschiedenen Spezies bestehen, sei darauf hier besonders eingegangen. Das tetramere Desoxyhämoglobin vermag organische Phosphate mittels Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den β -Ketten zu binden. Die Desoxystruktur wird dadurch so stabilisiert, daß die Sauerstoffaffinität sinkt und damit die Sauerstoffabgabe in den peripheren Geweben gewährleistet wird.

Die Erythrozyten adulter Vögel enthalten Inosit-Penta-Phosphat (IPP) in hoher Konzentration (16). Bei den meisten Säugern dagegen überwiegt 2,3-Diphosphoglycerat (DPG) (17). Bei einigen Fischen wirken Adenosin-Tri-phosphat (ATP) oder Guanosin-Triphosphat (GTP) als allosterische Effektoren (18).

Die Phosphate beeinflussen in der Reihenfolge 2,3-DPG - ATP-ITP-IPP-IHP in steigendem Maße die Senkung der Sauerstoffaffinität (19). Untersuchungen ergaben, daß während der Entwicklung eines Individuums vom embryonalen zum adulten Stadium, unterschiedliche Phosphate die Sauerstoffaffinität beeinflussen (16). Bei Vögeln wird damit vermutlich der Sauerstofftransport durch die Allantois-membran im Ei erleichtert.

Der Einfluß der verschiedenen Phosphate muß aber auch im Zusammenhang mit der Anwesenheit verschiedener Hämoglobine zu bestimmten Entwicklungsstufen gesehen werden. Zu berücksichtigen ist auch die Änderung der Erythrozytenstruktur und die Änderung der Sauerstoffzufuhr, die anfangs durch die Eischale erfolgt.

Abb: Auftreten verschiedener Phosphate zu bestimmten Entwicklungsstufen vor und nach dem Schlupf, in den Erythrozyten des Huhns (20).



Homologie

Ein Vergleich der Globinketten einer Art, aber auch unterschiedlicher Spezies, läßt signifikante Übereinstimmungen der Sequenzen erkennen. Die Ähnlichkeit zwischen α - und β -Ketten ist wegen der unterschiedlichen Kettenlänge weniger offensichtlich. Sie wird erst deutlich bei einer Schreibweise, bei der an bestimmten Positionen Lücken eingefügt werden. Die Ähnlichkeit zwischen den Sequenzen wird als Homologie bezeichnet. (21)

Die Homologie wird als Ergebnis von Genduplikationen während der Phylogenese interpretiert. (21) Man kann davon ausgehen, daß ein "Urgen" ein "Urglobin" codierte. Die Verdopplung dieses Gens, und die unterschiedliche Weiterentwicklung der daraus entstandenen Gene, haben zur Entstehung der unterschiedlichen Globine geführt. (22)

Die α^A - und α^D -Ketten der Vogelhämoglobine entstanden aus einer Genduplikation des α -Globingens, die vermutlich vor etwa 400 Millionen Jahren stattgefunden hat. (22)

Der Austausch einzelner Aminosäuren in homologen Ketten verschiedener Spezies, hat seinen Ursprung in Genmutationen. Durch den Austausch von einer (Einpunkt-) oder von zwei (Zweipunktmutation) Basen des Basentriplets kann eine andere Aminosäure codiert werden.

Die Entwicklung der Sequenzieretechnik Anfang der 60er Jahre führte zur Aufklärung vieler Aminosäuresequenzen. Vergleichende Untersuchungen lassen erkennen, daß mit abnehmendem Verwandtschaftsgrad auch die Anzahl identischer Aminosäuren in den Sequenzen abnimmt. (21)

Vergleicht man das Hämoglobin des Menschen (5) mit dem des Gorilla (23), so unterscheiden sich ihre Peptidketten nur durch den Austausch einer Aminosäure. Das Hämoglobin des Schimpansen (24), eines weiteren Primaten, zeigt keinen Unterschied zu dem des Menschen. Die Proteinketten von Mensch und Pferd (25) unterscheiden sich jedoch bereits in 17 Aminosäuren.

Der Sequenzvergleich ist somit eine Methode zur Bestimmung von Verwandtschaftsbeziehungen auf molekularer Ebene.

Phylogenese

Durch Vergleich von Aminosäuresequenzen läßt sich die Anzahl der Aminosäureaustausche ermitteln. Es gilt als gesichert, daß Sequenzabschnitte und einzelne Aminosäuren, die in vergleichbaren Sequenzen übereinstimmen, bereits in einem gemeinsamen Vorfahren so bestanden haben. Nach der Differenzierung und während der getrennten Weiterentwicklung der Spezies haben sich die heute bestehenden Unterschiede entwickelt.

An einem Beispiel sei nun erklärt, welche Beziehung zwischen Zeit und Änderung der Primärstruktur besteht. Die α -Ketten von Mensch und Pferd unterscheiden sich in 17 Aminosäuren. Die Untersuchung vieler fossiler Funde bestätigte die Theorie von der Existenz eines gemeinsamen Vorfahren von Mensch und Pferd. Mit den Daten dieser Untersuchungen konnte errechnet werden, daß die Differenzierung vor etwa 80×10^7 Jahren stattgefunden haben muß. Vorausgesetzt in beiden Ketten wurden die Aminosäuren statistisch gleich schnell ausgetauscht, sind es pro Kette 8 bzw 9 Austausche in 80×10^7 Jahren. Bei statistischer Gleichmäßigkeit läßt dies den Schluß zu, daß pro 10 Millionen Jahren ein Austausch je α -Kette eines vergleichbaren Hämoglobins stattgefunden hat. Damit sind die Voraussetzungen geschaffen, mit Hilfe der umfangreichen Strukturdaten des Hämoglobins, phylogenetische Stammbäume auf rein molekularer Basis zu berechnen. Diese Methode stellt eine wertvolle Ergänzung zu paläontologischen Arbeiten dar, weil die lückenhaften Dokumente von Fossilfunden nicht ausreichen, die Entwicklung der Arten vollständig zu klären.

Genetik

Die Primärstruktur eines Proteins wird durch die Nukleotidsequenz eines Gens bestimmt. Ein Basentriplet codiert je eine Aminosäure. Der Austausch einer einzigen Base kann genügen, eine andere Aminosäure zu codieren und damit die Struktur des gesamten Proteins verändern. Den ersten Beweis für die Synthese eines durch Genmutation veränderten Proteins erbrachte Ingram 1957. Er suchte nach der Ursache der Sichelzellanämie (30). Es gelang ihm die unterschiedliche Struktur zwischen dem sogenannten "normalen" adulten Human-Hb und dem Sichelzell-Hämoglobin aufzuklären. Der Unterschied besteht lediglich im Austausch einer Aminosäure. In der β -Kette ist an Position 6 Glutaminsäure durch Valin substituiert. Verursacht wird diese Substitution durch den Basenaustausch Adenin gegen Uracil im zweiten Nukleotid des Glutaminsäure spezifischen Codons (Guanin-Adenin-Guanin wird zu Guanin-Uracil-Guanin).

Durch Genmutation entstehen sogenannte "abnormale" Hämoglobine, die mit mehr oder minder starken Krankheits-symptomen einhergehen (31). Mutationen sind Änderungen der Basensequenz der DNA (z.B. durch Basenaustausch oder Deletion kurzer Nucleotidsequenzen). Ursachen sind häufig Fehler in der DNA Replikation, der Mitose oder der Meiose. Eine Genmutation die zu einem adaptiven Vorteil geführt hat, konnte beim Vergleich der Hämoglobinsequenzen von Lama (*Lama glama*) und Kamel (*Camelus dromedarius*) gefunden werden (32,33). Beide Tiere evolvierten aus einer gemeinsamen Stammlinie und gehören zur Familie der Camelidae. Sie leben jedoch in sehr unterschiedlichen Lebensräumen. Während das Kamel auf Meereshöhe oder in relativ niedrigen Höhen unter normoxischen Bedingungen lebt, hält sich das Lama in den südamerikanischen Anden in großer Höhe unter hypoxischen Bedingungen auf.

Erwartungsgemäß bestehen zwischen den Sequenzen nur geringe Unterschiede. 5 Substitutionen in den α -Ketten und 2 in den β -Ketten. Einer der beiden Austausche der β -Ketten, eine Phosphatbindungsstelle, erhöht die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins. Damit kann die "Höhenatmung" des Lamas molekular gedeutet werden und auf die Substitution einer einzigen Aminosäure zurückgeführt werden.

Die Globingene der Vögel

Umfangreiche Untersuchungen an den Genen wurden bei den Vogelarten Huhn und Ente durchgeführt. Daraus geht hervor, daß die Gene, die Globinketten codieren, auf mindestens zwei Chromosomen lokalisiert sind. Durch Gen-duplikation mit nachfolgender Modifizierung der Dupli-kationsprodukte entstanden α - und β -Globin-Genfamilien. Die beiden Genfamilien befinden sich auf getrennten Chromosomen. (34,35)

4 Globingene bilden die β -Familie. (35) In der DNA-Sequenz sind sie 5'... ρ , β^H , β , ϵ ...3' angeordnet (35). Das bedeutet, zwei Gene, die die bei adulten Tieren vor-kommenden Globinketten codieren (β^H -Ketten findet man während des Schlupfes, β -Ketten bei adulten Tieren) (35), liegen zwischen zwei Genen, die embryonale Ketten codie-ren (ρ , ϵ). Diese Anordnung stellt eine Besonderheit dar, weil bei den meisten Vertebraten die Globingene in der Reihenfolge ihrer zeitlichen Expression angeordnet sind, von embryonal zu adult vom 5' zum 3' Ende hin.

Abb: β -Globingen-Cluster des Huhns (35).

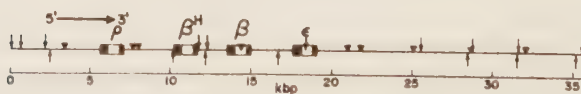
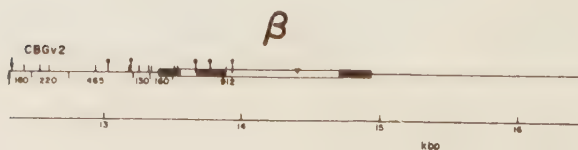


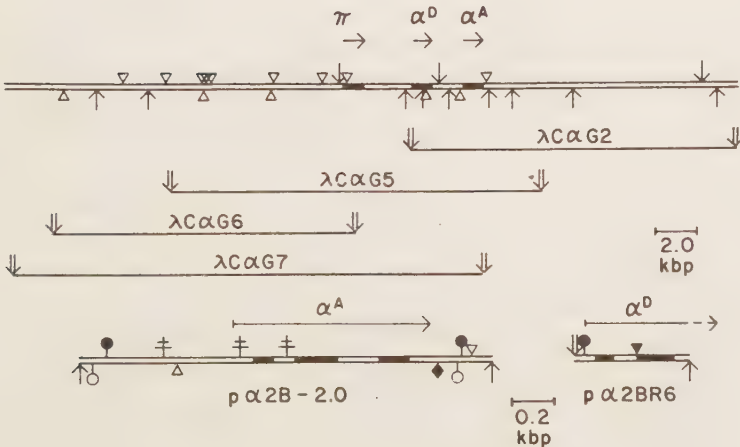
Abb: Gen der β -Kette des Huhns mit den 3 Exons und 2 Introns (35).



Die Gene haben meist keine durchgehend codierenden DNA-Sequenzen, sondern bestehen aus codierenden (Exon-) und nichtcodierenden (Intron-) Segmenten. Die Introns scheinen funktionslos zu sein, da sie nicht in funktionelle Messenger-RNA umgewandelt werden. Sie haben aber dennoch eine Bedeutung bei der Genexpression.

Die α -Globin-Genfamilie wird aus drei Genen gebildet. Ihre Reihenfolge in der DNA-Sequenz ist 5'... π , α^D , α^A ...3' (34). π exprimiert embryonale Ketten, α^A adulte Ketten, α^D kommt sowohl bei embryonalen als auch bei adulten Vögeln vor.

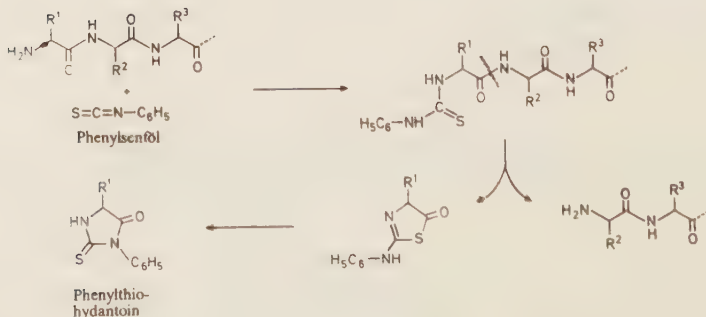
Abb: α -Globingen-Cluster des Huhns (34).



Sequenzermittlung

Bei der Ermittlung von Aminosäuresequenzen hat sich der Abbau nach P. Edman bewährt (36). Damit können Proteine vom Aminoende mit Phenylisothiocyanat schrittweise abgebaut werden. Bei der Reaktion mit der N-terminalen Aminogruppe entsteht ein Phenylthioharnstoffderivat, das sich von dem Restprotein abgespalten läßt. Dieses Derivat geht nach einer Hydrolyse unter Ringschluß in das Phenylthiohydantoin über, das extrahiert, mit chromatographischen und spektroskopischen Methoden identifiziert wird. Die Methode konnte weitgehend automatisiert werden. Bei dem sogenannten "Liquid-Phase-Sequencer" liegt das Protein als dünner Film an der Innenwand eines rotierenden Glaszylinders vor. Dadurch können die einzelnen Reaktionsschritte des Abbaus in relativ kurzer Zeit und zuverlässig durchgeführt werden (8).

Abb: Abbau einer Aminosäure von einem Protein mit Phenylisothiocyanat.



Die Schrittzahl dieses Abbauweges ist jedoch begrenzt (36). Abnehmende Ausbeuten, Überlappung nachfolgender Schritte und unspezifische Spaltungen in der Proteinkette führen dazu, daß nach einer bestimmten Schrittzahl allmählich die Ergebnisse unbrauchbar werden. Die sukzessive Abspaltung führt deshalb bei Globinketten nicht bis zum Ende. Man muß sie aus diesem Grund in kleinere Bruchstücke zerlegen. Dies kann durch enzymatische oder chemische Spaltmethoden geschehen. Trypsin spaltet zum Beispiel bei Arginin- und Lysinresten (37), mit Bromcyan ist eine spezifische, chemische Spaltung bei Methioninresten möglich (38).

Die entstehenden Peptide werden getrennt und deren Aminosäuresequenz ermittelt. Zur Trennung der Bruchstücke stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung:

1. Die Gelchromatographie (Ein Polysaccharid-Gel wirkt als Molekularsieb; Peptide können mit geeigneten Lösungsmitteln, nach Molekülgröße getrennt, eluiert werden).
2. Die Ionenaustauschchromatographie (Peptide werden nach ihrer Ladung getrennt).
3. Die Umkehrphasenchromatographie (Peptide werden nach der Polarität getrennt).

Mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographieanlagen (HPLC) kann die Trenngeschwindigkeit enorm beschleunigt und die Trennschärfe gesteigert werden (39).

Die Dünnschichtelektrophorese eignet sich dafür, isolierte Peptide hinsichtlich Größe, Reinheit und Vorkommen bestimmter Aminosäuren zu charakterisieren. Bei dieser Methode wird ein Aliquot des Peptides auf eine Celluloseschicht aufgetragen und nach einer bestimmten Elektrophoresedauer durch Färbung mit Ninhydrin sichtbar gemacht. Peptide die Tyrosin oder Histidin, Arginin oder Tryptophan enthalten, können mit spezifischen Färbemethoden nachgewiesen werden.

Peptide, die sich als rein erweisen, werden säurehydrolytisch gespalten. Das dabei entstehende Gemisch aus einzelnen Aminosäuren wird mittels Ionenaustauschchromatographie in einem automatischen Verfahren analysiert (Aminosäureanalysator) (40) . Aus der Analyse lassen sich Art und Anzahl der Aminosäuren, d.h. die Bruttoformel des Peptids errechnen. Im Sequenator wird anschließend die Reihenfolge der Aminosäuren bestimmt.

Die sequenzierten Peptide müssen in der richtigen Reihenfolge zusammengesetzt werden, um die Sequenz des kompletten Proteins zu erhalten. Es wird das Prinzip der "überlappenden Spaltung" angewendet: Spaltet man das Protein mit einer anderen Protease, z.B. mit Pepsin anstatt Trypsin, so erhält man andere Spaltstücke aus der gleichen Sequenz. Wenn nun eines der peptischen Peptide die ersten drei, und ein anderes die letzten vier Aminosäuren eines tryptischen Peptids, das aus sieben Aminosäuren besteht, enthält, weiß man, daß diese peptischen Teile zusammen gehören.

Der Vergleich mit ähnlichen, bereits bekannten Sequenzen bietet eine andere Möglichkeit, Bruchstücke richtig einzuordnen. Gerade Proteine mit der gleichen Funktion (z.B. Hämoglobine verschiedener Spezies) sind in einigen Sequenzabschnitten sehr ähnlich. Durch die Homologie der Ketten gelingt die Einordnung der Peptide häufig recht gut.

III. MATERIAL und METHODEN

1. Gewinnung des Blutes, Hämolyse, Hämabspaltung

1.1. Feldsperling, *Passer montanus* (L., 1758)

1.1.1 Hämoglobingewinnung

Die Blutentnahme erfolgte im Institut für Geflügelkrankheiten der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München. Das Blut wurde mit einer heparinisierten Spritze (Vetren^R-3000 IU/ml) aus der Jugularvene entnommen. Das Blut wurde 10 Minuten bei 3000 $\times$ g zentrifugiert, das Plasma verworfen. Die Erythrozyten wurden 3 mal mit 0,9 %iger Kochsalzlösung gewaschen und zentrifugiert, danach in flüssigen Stickstoff eingetropfte (schockgefroren), und bei - 80 °C aufbewahrt.

1.1.2 Hämolyse

Beim Auftauen der Erythrozyten platzen bereits zu einem großen Teil deren Membranen. Um eine vollständige Hämolyse zu erreichen wurde mit dem doppelten Volumen Aqua bidest. aufgefüllt, und die Lösung eine Stunde lang kühl stehen gelassen. Danach wurde bei 14 000 $\times$ g zentrifugiert. Der Rückstand, gequollenes Membran- und Kernmaterial, wurde 3 mal mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen und zentrifugiert, um anhaftendes Hämoglobin zu extrahieren.

1.1.3 Hämabspaltung nach Rossi-Fanelli (41)

Die 3 %ige Lösung wurde zur Gewinnung des Gesamtglobins unter stetigem Rühren, langsam in salzsaures Aceton (10 ml 37 %ig HCl/l Aceton), das auf - 14 bis - 18 °C gekühlt war, eingetropfte. Das Häm bleibt in Lösung, das Globin fällt als flockiger Niederschlag aus. Nach 2 Stunden Ruhen in der Kälte setzt sich das Globin ab.

Das überstehende Aceton mit dem gelösten Häm wurde abgezogen. Das abgesetzte Globin wurde mit kaltem Aceton 5 x gewaschen und abzentrifugiert, um alle Hämreste zu entfernen. Das Globin wurde in etwas Aqua bidest. aufgenommen, das restliche Aceton mittels Rotationsverdampfer entfernt, und die Globinlösung auf 15 ml eingengt und lyophilisiert. Das lyophilisierte Material konnte dann bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

1.2. Araukanerhuhn, Gallus gallus, forma araucana (Castello, 1921)

1.2.1 Die Blutentnahme erfolgte im Institut für Geflügelkrankheiten der L M U München. Das Blut wurde mit einer heparinisierten Spritze durch Punktion einer Flügelvene gewonnen. Das Blut wurde 10 Minuten bei 3 000 x g zentrifugiert, das Plasma verworfen, die Erythrozyten 3 x mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen und zentrifugiert.

1.2.2 Hämolyse

Zur Lyse der Erythrozyten wurde mit dem zweifachen Volumen aufgefüllt, die Lösung 2 Stunden lang unter gelegentlichem Schütteln stehen gelassen und bei 16 000 x g zentrifugiert. Der Rückstand wurde 3 x gewaschen (siehe 1.1.2). Zur Entfernung von Lipiden wurde die Hämoglobinlösung mit 1 ml CCl_4 ausgeschüttelt.

1.2.3 Hämabspaltung

Die Abspaltung des Häm erfolgte durch saure Acetonfällung. (siehe 1.1.3)

1.3. Bankivahuhn, Gallus gallus (L., 1758)

1.3.1 Hämoglobingewinnung siehe 1.2.1

1.3.2 Hämolyse siehe 1.2.2

1.3.3 Hämabspaltung siehe 1.2.3

2. Kettentrennungen

2.1 Feldsperling

2.1.1 Die Trennung der Globinketten erfolgte über CM-Cellulose (Whatman Pre-Swollen) Ionenaustausch-chromatographie.

Säule Ø 2,5 x 15 cm (73 ml)

Startpuffer: 0,05 M Natriumacetat

0,2 % Mercaptoethanol

8 M Harnstoff

mit Essigsäure ad pH 5,25

Gradient A : linear

300 ml Startpuffer

300 ml Startpuffer + 0,05 M NaCl=Puffer A

Gradient B : 300 ml Puffer A

300 ml Startpuffer + 0,2 M NaCl= Puffer B

Flußrate : 24 ml / h

Fraktionen : 6 ml / 15 Min.

150 mg Globin wurden in 12 ml Startpuffer gelöst, der pH-Wert mit Essigsäure auf pH 4,0 eingestellt. Die Lösung wurde auf die Säule gepumpt und mit ca. 50 ml Startpuffer gewaschen. Die Elution der Polypeptidketten erfolgte durch einen linearen Kochsalzgradienten in der Weise, daß im ersten, offenen Gradientengefäß 300 ml Startpuffer vorgelegt wurden, und aus dem zweiten Gefäß sukzessive Puffer A zugesetzt wurde. Nachdem beide Kammern leer waren, wurde in das erste Gefäß 300 ml Puffer A vorgelegt, und aus dem zweiten Gefäß 300 ml Puffer B sukzessiv zugesetzt. Die Extinktion der eluierten Lösung wurde bei 280 nm von einem Durchfluß-photometer (I S C O UA-5) aufgenommen.

Die vereinigten Gipfelfraktionen wurden gegen 0,1 N Essigsäure 2 Stunden lang dialysiert, am Rotationsverdampfer auf ca. 30 ml eingengt und über Sephadex G-25 medium entsalzt.

Die entsalzten Globinlösungen wurden erneut eingengt und lyophilisiert. Die Reinheit der Ketten wurde elektro-phoretisch überprüft.

2.2 Araukanerhuhn

2.2.1 Die Trennung der Ketten erfolgte über C M 52 Cellulose.

Säulen : $\varnothing$ 2,5 x 17 cm (=83 ml)

Startpuffer : 0,002 M Natriumacetat

0,2 % Mercaptoethanol

8 M . Harnstoff

mit konz. Essigsäure ad pH 5,4

Gradient A : logarithmisch

300 ml Startpuffer

300 ml Startpuffer + 0,1 M NaCl = Puffer A

Gradient B : linear

350 ml Puffer A

350 ml Startpuffer + 0,17 M NaCl = Puffer B

Gradient C : 150 ml Puffer B

150 ml Startpuffer + 0,5 M NaCl = Puffer C

500 mg Globin wurden in 40 ml Startpuffer gelöst und

mit konzentrierter Essigsäure auf pH 4,5 titriert.

Die Lösung wurde auf die Säule gepumpt und mit 70 ml Startpuffer gespült. Die Elution der Proteine erfolgte

mit logarithmischen und linearen Gradienten. In die

vordere geschlossene Kammer des Gradientengefäßes wurden

300 ml Startpuffer vorgelegt. In die hintere offene

Kammer 300 ml Puffer A. Dadurch ergab sich ein loga-

rithmischer Gradientenanstieg auf 0,1 M NaCl. Als

zweiter Gradient wurde in die vordere Kammer

350ml Puffer A, in die hintere Kammer Puffer B 350ml

gegeben. Beide Kammern blieben offen, wodurch sich

ein linearer Anstieg des Gradienten ergibt. Um auch

das letzte, noch auf der Säule befindliche Protein

zu eluieren, wurde noch ein dritter, wieder logarith-

mischer Gradient angelegt. 150ml Puffer B in der

vorderen geschlossenen Kammer und 150 ml Puffer C in

der hinteren offenen Kammer. Die Extinktion des Eluates

wurde bei 280 nm wie bei 2.1.1 beschrieben, gemessen,

und die Verarbeitung ebenso durchgeführt.

3. Elektrophoresen

3.1 Gelelektrophoresen

Für die Polyacrylamid- Gelelektrophoresen wurden Rundgele verwendet ($\emptyset$ 0,5 x 7,5 cm).

3.1.1. Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen:

Diese Elektrophorese wurde in Anlehnung an die Veröffentlichung von Davis " Disk Elektrophoresis " (42) durchgeführt. Mit dieser Methode wurde unter nativen Bedingungen die Verteilung der Hämoglobinkomponenten untersucht.

Gelzusammensetzung : 10 % Acrylamid- Bisacrylamid

0,4 M Tris/ HCl-Puffer pH 8,9

Elektrophoresepuffer : 0,07 M Tris/Glycin Puffer pH 8,3

Es wurden 20-40 μ g, mit Saccharose beschwerte Proben aufgetragen. Nach einer kurzen Zeit des Konzentrierens, bei 1 mA / Gel, liefen die Elektrophoresen 45-60 Minuten mit 4,5 mA / Gel, bei Raumtemperatur. Die Proteinbanden wurden zur besseren Sichtbarmachung und um eine Verbreiterung durch Diffusion zu verhindern mit einer 10 %igen Amidoschwarz-(10 B)-Lösung in 7 %iger Essigsäure gefärbt und fixiert. Die Proteine werden dadurch irreversibel gefärbt, während der Farbstoff aus dem Gel mit 7 %iger Essigsäure wieder entfernt werden kann. Entfärbezeit : ca. 24 Stunden.

3.1.2 Triton-Gelelektrophorese :

Die Elektrophorese von Globinketten wurde unter denaturierenden Bedingungen nach der Methode von Rovera (43) durchgeführt.

Gelzusammensetzung : 12 % Acrylamid-Bisacrylamid

8 M Harnstoff

5 % Essigsäure

2 % Triton-X 100

Elektrophoresepuffer : 5 % Essigsäure

Probenpuffer : 8 M Harnstoff

8 % Essigsäure

8 % Mercaptoethanol

Die Vorelektrophorese dauerte eine Stunde bei 200 Volt, die Elektrophorese 3Std 50min bei 140 Volt. Zwischen 10 - 40 µg Protein wurden, in 20 - 40 µl Probenpuffer gelöst, auf das Gel aufgetragen. Färbung und Entfärben wie 3.1.1 mit Amidoschwarz-Essigsäurelösung bzw Essigsäure.

3.2 Dünnschichtelektrophorese (D C-Elektrophorese) :

Mit der Dünnschichtelektrophorese wurde die Reinheit und Einheitlichkeit der peptidhaltigen HPLC-Fraktionen überprüft und gleichzeitig konnte damit deren Konzentration abgeschätzt werden. Als Trägermaterial dienten D C-Cellulose-Platten, Schichtdicke 0,1 mm. Es wurden bis zu 10 µl wässriger Lösung mit 0,5 - 2 nmol Peptid getüpfelt. Nach dem Trocknen der getüpfelten Lösungen mit einem Föhn wurden die Platten mit Elektrophoresepuffer besprüht und unmittelbar in die geschlossene Kammer horizontal eingelegt.

Platten : DC - Fertigplatten Cellulose 10 x 20 cm
Schichtdicke 0,1mm (E. Merck, Darmstadt)

Elektrophoresepuffer : 5 % Pyridin
5 % Aceton
Essigsäure ad pH 5,4
in Wasser

Laufzeit: 45 - 60 Minuten

Spannung: 450 Volt, 12- 15 mA

Das Elektrophoresebett wurde mit Fließwasser gekühlt, um das Austrocknen der Platten zu verhindern. Nach der Elektrophorese wurden die Platten kurz bei 80°C getrocknet und die Peptide mit Ninhydrin sichtbar gemacht. Zur Erkennung der Tyrosin- und Histidin-haltigen Peptide wurden die Platten zusätzlich mit diazotierter Sulfanilsäure besprüht.

4. Oxidation

Cysteine und Methionine wurden, um die Bildung von Disulfidbrücken zu verhindern, mit Perameisensäure oxidiert. Ameisensäure und 30 %iges Perhydrol wurden 10 : 1 gemischt und eine Stunde lang im Dunkeln und bei Raumtemperatur stehen gelassen und zu Perameisensäure umgesetzt. 10-30 mg Globinketten wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß in ca. 50 µl konzentrierter Ameisensäure gelöst und die Lösung bis knapp über den Gefrierpunkt gekühlt. Die kalte Lösung wurde mit ca. 100 µl ebenfalls gekühlter Perameisensäure 10 min. inkubiert, danach mit 10-15 ml kaltem Aqua bidest. verdünnt. Die überschüssige Perameisensäure wurde am Rotationsverdampfer abrotiert und das Protein dann lyophilisiert.

5. Enzymatische und chemische Spaltungen

5.1 Feldsperling α^A - Kette

5.1.1 Tryptische Spaltung der α^A - Kette

15 mg (entspr. ca. 1 µmol) oxidierte α^A - Ketten wurden in 2 ml Aqua bidest. gelöst und mit Ammoniaklösung auf pH 10,8 titriert. Nach Zugabe von 0,3 mg TPCK-Trypsin (Fa. Worthington) wurde 2 Stunden lang bei Raumtemperatur gespalten. Danach wurde mit konzentrierter Essigsäure der pH-Wert auf 8,7 titriert, 0,2 mg Trypsin zugegeben und 3 Stunden lang weitergespalten. Die Spaltung wurde durch Absenken des pH mit Essigsäure auf 3,4 gestoppt.

5.1.2 Hydrolytische Spaltung der Asp-Pro Bindung
der α^A -Ketten

10mg native α^A -Ketten wurden in 1 ml 70%iger Ameisensäure, 6 M Guanidin/HCl gelöst und 72 Stunden bei 41 °C inkubiert. Nach dem Zusatz von 0,5 ml 8 M Harnstoff in 10% Ameisensäure wurde das Gemisch durch Gel-filtration getrennt.

5.2 Feldsperling α^D -Ketten

5.2.1 Tryptische Spaltung der α^D -Ketten

15 mg oxidierte α^D -Ketten wurden in 1 ml Aqua bidest. gelöst, mit Ammoniaklösung auf pH 10,9 titriert und 0,3 mg TPCK-Trypsin dazugegeben. Der pH-Wert wurde sich selbst überlassen und war nach einer Stunde auf pH 10,6 abgesunken. Es wurden nochmals 0,2 mg Trypsin zugegeben. Der pH sank auf 10,48. Nach einer Stunde wurde die Spaltung durch Zugabe von Essigsäure bis pH 3,4 gestoppt.

5.3 Feldsperling β -Ketten

5.3.1 Tryptische Spaltung der β -Ketten

15 mg oxidierte β -Ketten wurden in 2 ml Aqua bidest. gelöst, mit Ammoniaklösung auf pH 8,72 titriert und 0,3 mg TPCK-Trypsin zugegeben. Das Volumen betrug dann etwa 4 ml. Nach einer Stunde Spaltung wurden erneut 0,2 mg Trypsin zugegeben. Nach 3 Stunden wurde die Spaltung durch Titrieren mit Essigsäure auf pH 3,9 beendet.

5.3.2 Hydrolytische Spaltung der Asp-Pro Bindung der β -Ketten

16 mg nativer β -Ketten wurden in 1 ml 70% iger Ameisensäure 6 mol Guanidin/HCl gelöst und 72 Stunden bei 41 °C inkubiert. Nach dem Zusatz von 0,5 ml 8 mol Harnstoff in 10% Ameisensäure wurde das Gemisch durch Gelfiltration getrennt.

5.4 Araukanerhuhn

5.4.1 Tryptische Spaltung der α^A -Ketten

16 mg α^A - Ketten, oxidiert, wurden in 2 ml Aqua bidest. gelöst, mit Ammoniaklösung auf pH 11 titriert und 0,3 mg TPCK-Trypsin zugegeben. Das Volumen betrug danach 4 ml. Nach 3 Stunden Spaltung wurde der pH-Wert auf 8,6 mit Essigsäure eingestellt, 0,2 mg TPCK-Trypsin zugegeben und weitere 3 Stunden gespalten. Die Spaltung wurde durch Titration mit Essigsäure auf pH 3,5 beendet.

5.5.1 Tryptische Spaltung der α^D -Ketten

15 mg oxidierte α^D - Ketten wurden in 3 ml Aqua bidest. gelöst und 0,3 mg TPCK-Trypsin zugegeben. Der pH-Wert war mit Ammoniaklösung auf 11 eingestellt worden. Nach 1 1/2 Stunden Spaltung wurde der pH auf 8,5 titriert, 0,2 mg TPCK-Trypsin zugegeben und nochmals 1 1/2 Stunden gespalten. Die Spaltung wurde durch Zugabe von Essigsäure bis pH 3,9 gestoppt.

6. Isolierung der Peptide

6.1 Gelfiltration

6.1.1 Die Vortrennung tryptischer Peptide erfolgte durch Gelfiltration über Sephadex G-25 fine in 0,1N Essigsäure. Die Peptidgemische wurden in Volumina von 2-3 ml manuell auf die Säule aufgetragen.

Säule: Ø 2,5 x 190 cm (932 ml)

Eluens: 0,1 N Essigsäure

Flußrate: 24 ml / h

Fraktionen: 6 ml / 15 Min.

Die Extinktion der eluierten Fraktionen wurde bei 280 nm im Durchflußphotometer und bei 230 nm in einem Gerät für diskontinuierliche Extinktionsmessungen vermessen. Vereinigte, peptidhaltige Gipfelfraktionen wurden mit einem Rotationsverdampfer auf je 1,5 ml eingeeengt und bei -20° C aufbewahrt.

6.1.2 Trennung der Peptide der säurehydrolytischen Spaltung.

Die Peptide aus der säurehydrolytischen Spaltung wurden durch Gelfiltration über Sephadex G-50 fine in 8 M Harnstoff/10% Ameisensäure isoliert. Die Peptidgemische wurden manuell in einem Volumen von 1,5 ml aufgetragen.

Säule: 2,5 x 190 cm (932 ml)

Eluens: 8 M Harnstoff / 10% Ameisensäure

Flußrate: 20 ml / h

Fraktionen: 5 ml / 15 Min.

Die Extinktion des Eluats wurde im Durchflußphotometer bei 280 nm vermessen.

Peptidhaltige Fraktionen wurden über Sephadex G-25 medium entsalzt.

Säule : Ø 2,5 x 150 cm (736 ml)

Eluens : 0,1 bzw 1 N Essigsäure

Flußrate : 200 ml / h

Fraktionen : 10 ml / 3 Min.

Auftragsvolumina : 30-120 ml

Das Eluens wurde bei 230 nm vermessen und die proteinhaltigen Fraktionen eingengt und lyophilisiert.

6.2 Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

HPLC - Gerät : Beckman, Gradient Liquid Chromatograph
Model 334, Controller 421.

Photometer : Biotronik BT 3030

Schreiber : Shimadzu C-R 2A

Säulen : 45 x 250 mm

Zur Peptidtrennung kamen folgende Umkehrphasen als Säulenfüllmaterialien zur Anwendung :

LiChrosorb RP 2 Partikelgröße 7 µm Merck, Darmstadt.

LiChrosorb RP 8 Partikelgröße 7 µm Merck, Darmstadt.

Vydac TP-RP 18 Partikelgröße 10 µm Chrompack, Nederland.

LiChrosorb RP 18 Partikelgröße 5 µm Merck, Darmstadt.

Die Säulen wurden selbst gepackt mit einem Shandon Packgerät der Firma Gynkotheek, München.

Es wurden flüchtige Puffer verwendet :

0,05 M Ammoniumacetat für LiChrosorb

0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) für Vydac

Organisches Lösungsmittel war Acetonitril.

Gradienten : 0 - 65 % Acetonitril

Flußraten : 1 - 2,5 ml / Min.

Detektion : 230 nm

Die Trennung erfolgte bei Raumtemperatur. Je Lauf konnten 2 - 100 nmol Peptide in 10 - 500 µl wässriger Lösung injiziert werden. Die Fraktionen wurden manuell gesammelt und im Stickstoffstrom getrocknet.

7. Analysen

Zur Bestimmung der Bruttoformeln von Globinketten und Peptiden stand ein Analysator der Firma Biotronik, Model LC 5000 zu Verfügung.

Substanzmengen von 2 - 20 nmol wurden in 5,7 N HCl in Vakuum, 20 bzw 200 Stunden bei 110° C hydrolysiert.

Cystein- und Methionin-haltige Peptide wurden vor der Hydrolyse mit Perameisensäure oxidiert. Die Zerstörung von Tryptophan wurde durch Zusatz von Thioglykolsäure verhindert. Die Hydrolysate wurden in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und danach , in Citratpuffer gelöst, in einem Volumen von ca. 100 µl in den Analysator gegeben.

8. Sequenzanalyse

Globinketten und Peptide wurden nach Edman - Begg (8) mit der Filmtechnik im automatischen Aminosäuresequenator (Beckmann 890B, 890C, 890CII) abgebaut.

Quadrolprogramm: (0,25M Quadrol als Kupplungspuffer)
Polypeptidketten und mit Reagenz IV modifizierte Lysin-Peptide (44).

Propinprogramm: (1,25M Diethylaminopropin, pH 9 als Kupplungspuffer)

Arginin -Peptide, C-terminale hydrolytische Peptide, kleine (bis 4 Aminosäuren) hydrophile, sowie große hydrophobe und mit Reagenz I modifizierte Lysin- Peptide. Die Konversion erfolgte entweder automatisch im Auto-konverter (Sequemat P-6, Fa. Kontron Technik GmbH.) mit 3M TFA bei 60° C oder manuell mit 3M TFA, 14 Min. bei 80°C.

Die Identifizierung der PTH- Aminosäuren erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie in drei aufeinanderfolgenden Systemen oder mittels HPLC.

Dünnschichtchromatographie:

Platten: DC - Fertigplatten, Kieselgel 60 F 245, 0,25 mm

System I: Propionsäure - Tert. butylester (Merck).

System II: 80% Ethylenchlorid, 20% Essigsäure.

System III: 10% Essigester, 50% Methanol, 2% Essigsäure,
38% Ethylenchlorid.

Es wurden ca.10 nmol PTH- Aminosäurelösung in 1-5 µl
Essigester - Methanol (1:1) getüpfelt.

HPLC:

System A: Stufengradientenelution mit einem Gerät
der Firma Hewlett Packard (1084 B
Liquid Chromatograph)

Säule: RP 18 ODS - Hypersil, Shandon, 46x250 mm.

Flußrate: 1,2 ml/Min.

Puffer A: 10 mM Ammoniumacetat pH 4,8

Puffer B: Acetonitril

Stufengradient: Nach 0 Min. 10% B

" 1 " 20% B

" 5 " 45% B

" 14 " 70% B

" 19 " 10% B

Temperatur: 60° C

Detektion: Multichromatisches Licht 254 nm gegen 330 nm.
Serin und Threonin geben negative Gipfel.

System B: Isokratische Elution

Säule: Siehe oben

Puffer: 0,685 ml 0,01 M Natriumacetat pH 5,2
0,315 ml Acetonitril, 5 ml Dichlorethan

Flußrate: 1,7 ml/Min.

Temperatur: 60° C

Detektion: 265 nm

Für die HPLC wurden 1 - 3 nmol PTH aufgetragen.

IV. ERGEBNISSE

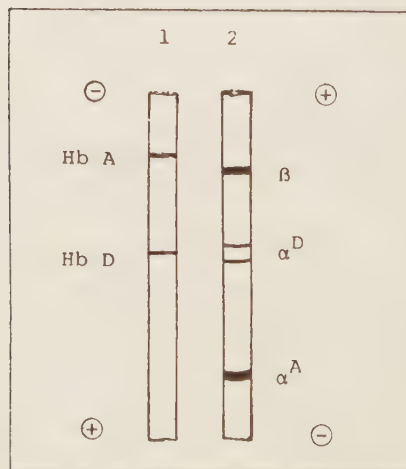
Das Hämoglobin des Feldsperlings

9. Gewinnung und Aufarbeitung des Feldsperlingblutes

Das Blut stammt von adulten Tieren. Die Entnahme erfolgte wie in Abschnitt 1.1.1 der Methoden beschrieben. Hämolyse und Hämabspaltung wurden, wie in den Abschnitten 1.1.2 und 1.1.3 beschrieben, durchgeführt. Von Vögeln ist bekannt (45-52), daß ihr Hämoglobin aus einer oder mehreren Komponenten besteht. Zur Bestimmung der Hämoglobinkomponenten wurde eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Unter nativen Bedingungen sind zwei Banden zu sehen, entsprechend zwei Komponenten, Hb-A und Hb-D (Bild 1, links).

Analytisch wurden die Globinketten des Gesamthämolysates durch Triton-Gelelektrophorese bestimmt. Es ergaben sich vier Banden. Die β -Ketten wandern als einheitliche Bande am langsamsten, die α^A -Ketten am weitesten, ebenfalls einheitlich. Die α^D -Ketten spalten sich in zwei Banden auf, die zwischen den Banden der beiden anderen Ketten liegen. Die α^D -Ketten sind jedoch nach der Sequenzanalyse dennoch einheitlich.

Bild 1



Polyacrylamid- Gelelektrophorese

Bahn 1, native Bedingungen. 10%iges Gel.

Auftragsmenge: 50 µg Hb

Die Banden sind einheitlich

Bahn 2, denaturierende Bedingungen, 12%iges Gel.

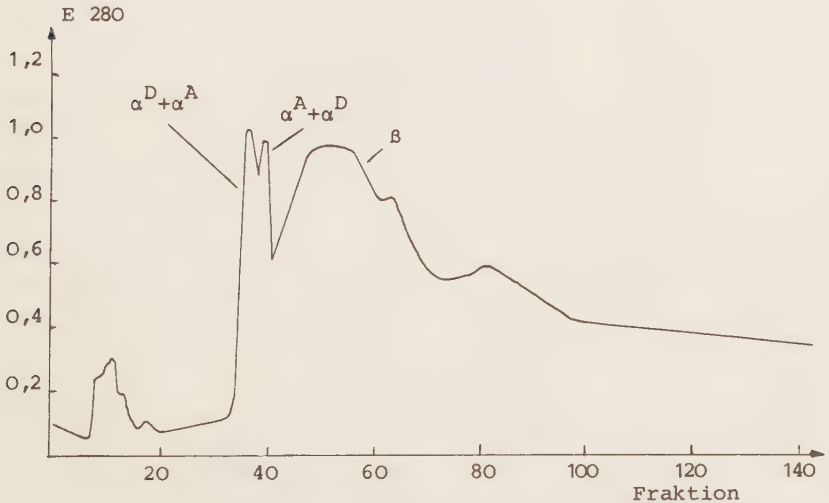
Auftragsmenge: 100 µg Hb

Banden der α^A - und β -Ketten einheitlich. α^D -Ketten spalten auf.

10. Kettentrennung

Es wurden mehrere Trennungen der Globinketten an Carboxymethylcellulose (CM) durchgeführt. Es ergaben sich zunächst keine befriedigenden Trennergebnisse, da die Fraktionen der α^A - Ketten einen hohen Anteil α^D - Ketten enthielten, und umgekehrt die α^D - Fraktionen einen hohen Anteil an α^A - Ketten. Die β -Ketten waren einheitlich.

Diagramm 1



Kettentrennung des Feldsperlingglobins über CM-Cellulose

Säule : Ø 2,5 x 15 cm

Puffer: 0,02 M Natriumacetat, pH 5,50, 8 M Harnstoff, 0,2% Mercaptoethanol

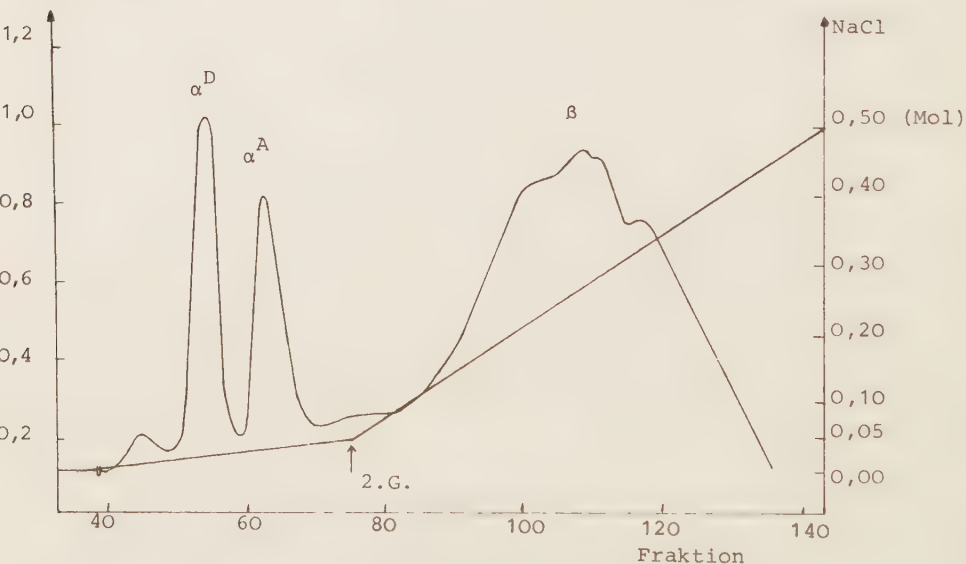
Gradient: 0,1 - 0,5 M NaCl (0,0-0,1 logarithmisch, 0,1-0,2 linear, 0,2-0,5 logarithmisch), 10 ml/15 min

Probe : 10 mg Globin in 10 ml Startpuffer.

Durch die schrittweise Veränderung einzelner Parameter konnte die Trennung verbessert werden. Zur Elution der α - Ketten wurde ein flacher, linearer Gradient gewählt. Für die β - Ketten war ein steiler, linearer Gradient günstiger, da diese sonst als sehr breiter Gipfel eluiert werden. Diagramm 2 zeigt das Elutionsprofil der verbesserten Trennung.

Diagramm 2

E_{280}



Kettentrennung des Feldsperling-Globins über CM-Cellulose

Säule : $\varnothing$ 2,5 x 15 cm

Puffer: 0,02 M Natriumacetat, pH 5,25, 8 M Harnstoff, 0,2% Mercaptoethanol

Gradient: 1. 0,00 - 0,05 M NaCl 300 ml linear

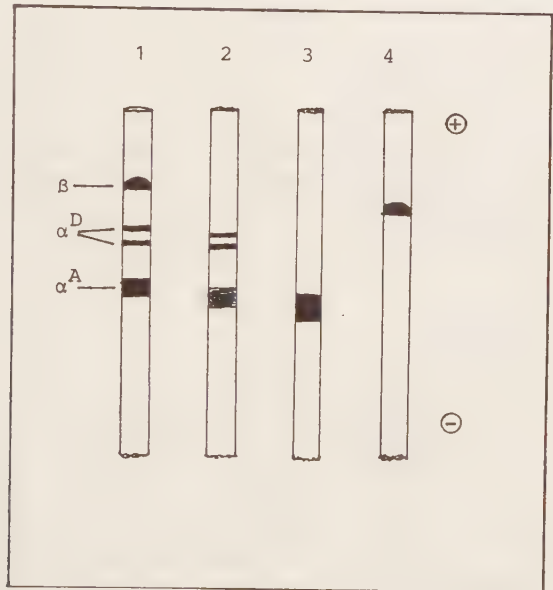
2. 0,05 - 0,20 M NaCl 300 ml linear

Flußrate: 6 ml/15 min

Probe : 100 mg in 20 ml Startpuffer

Die Reinheit der Ketten wurde in der denaturierenden Elektrophorese überprüft. Die Banden der α^A - und der β - Ketten waren einheitlich. Die α^D - Ketten spalteten in zwei Banden auf, und es ist erkennbar, daß ein Teil α^A - Ketten nicht von den α^D - Ketten abgetrennt werden konnte.

Bild 2



Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Gipfelfractionen (Diagramm 2) der Kettentrennung.

Denaturierende Bedingungen, pH 2,5, 12%iges Gel.

Bahn 1 : Gesamthämoglobin 30 μ g

Bahn 2 : 30 μ g aus dem ersten Gipfel = α^D - Ketten mit einem Anteil α^A - Ketten

Bahn 3 : 30 μ g aus dem zweiten Gipfel = α^A - Ketten

Bahn 4 : 30 μ g aus dem dritten Gipfel = β - Ketten

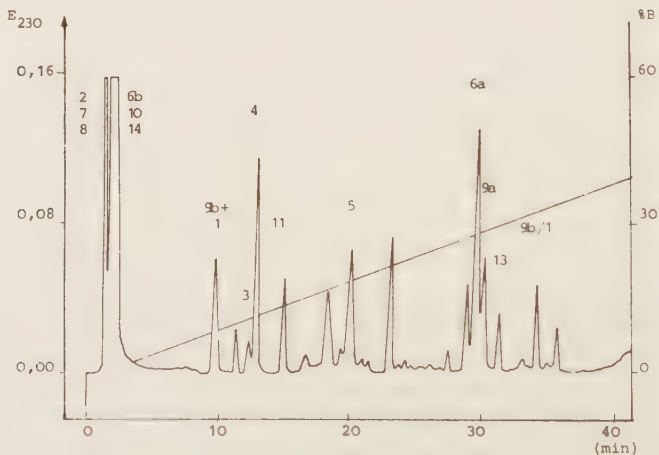
11. Tryptische Spaltung und Isolierung der α^A - Ketten

11.1 Die Oxidation der α^A - Ketten erfolgte wie in Abschnitt 4. der Methoden beschrieben, die Spaltung wurde mit Trypsin durchgeführt, wie unter 5.1.1 beschrieben. Es wurde TPCK - Trypsin verwendet, dessen chymotryptische Aktivität durch TosPheCH₂Cl verhindert ist.

Peptide der α^A - Ketten

11.2 Die Isolierung der α - Ketten Peptide erfolgte mittels HPLC an RP-2 LiChrosorb Material. Puffer:Ammoniumacetat, Lösungsmittelgradient: Acetonitril. Das Elutionsprofil ist in Diagramm 3 dargestellt. Die Zahlen über den Gipfeln bezeichnen die darin gefundenen tryptischen Peptide. Die Peptide wurden durch Analysen identifiziert.

Diagramm 3



Trennung der tryptischen Peptide der α^A -Kette des Feldsperlings.

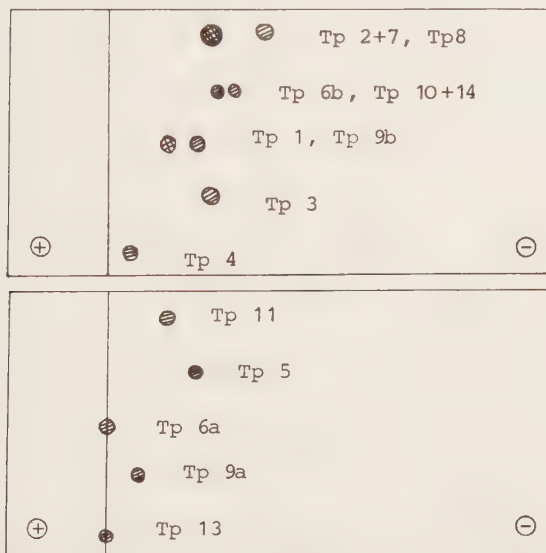
HPLC, Säule: RP-2, 7 µm LiChrosorb, Puffer A: 0,05 M

Ammoniumacetat, pH 6, Puffer B: Acetonitril

Gradient: Nach einer Minute von 0 auf 40% B in 40 Minuten,

Flußrate: 2 ml/min.

Dünnschichtelektrophorese
der Gipfelfractionen der α^A -Peptidtrennung

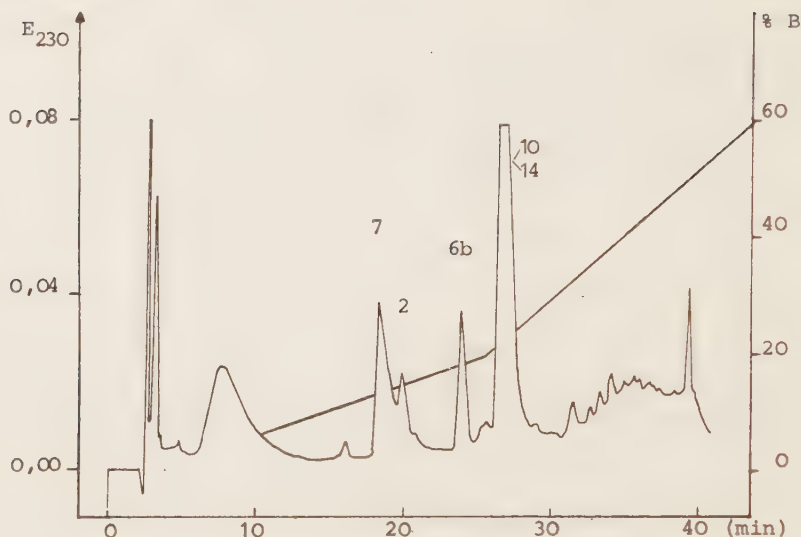


-  = Ninhydrin positiv
 = zusätzlich Tyr, His positiv

Die ersten Gipfel enthalten mehrere Peptide, die nicht getrennt waren.

11.3. Die Trenneigenschaften von RP-2 LiChrosorb sind für kleinere Peptide weniger gut. Deshalb befanden sich mehrere kleine Peptide gemeinsam in den Anfangsfractionen. Die Trennung dieser Peptide gelang durch die Rechromatographie an RP-18 LiChrosorb-Material. Trennung siehe Diagramm 4.

Diagramm 4



Rechromatographie der Anfangsgipfel aus der Trennung der Peptide an RP-2 LiChrosorb.

HPLC, Säule: RP-18, 5 μ m LiChrosorb

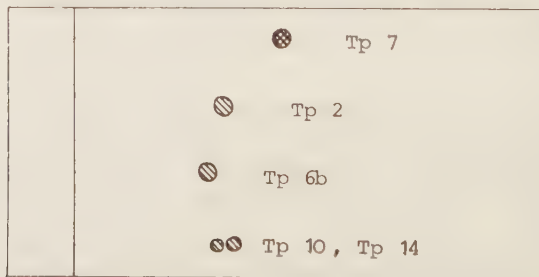
Puffer A: 0,1% Trifluoressigsäure

Puffer B: Acetonitril

Gradient: Nach 5 Minuten von 0 auf 20% in 20 Minuten

Flußrate: 1 ml/min.

DC-Elektrophorese

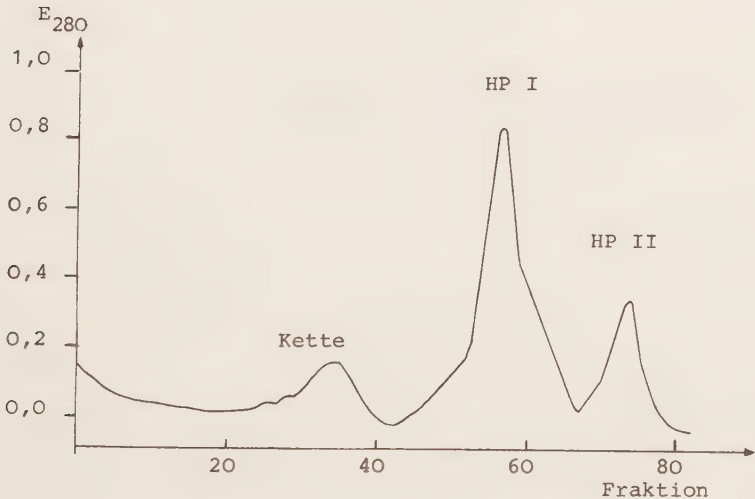


DC-Elektrophorese der Gipfelfractionen der Rechromatographie. Die Peptide konnten rein erhalten werden und wurden durch Analysen identifiziert.

11.4 Hydrolytische Spaltung der Asp-Pro Bindung der α^A - Ketten

Die Sequenz von Position 100 bis 127 wurde am C-terminalen hydrolytischen Peptid (HP II) ermittelt. Natives Kettenmaterial wurde, wie in Abschnitt 5.1.2 der Methoden beschrieben, gespalten und die Peptide, wie in Abschnitt 6.1.2 beschrieben, isoliert. Das Elutionsprofil der Peptidtrennung ist in Diagramm 5 wiedergegeben.

Diagramm 5



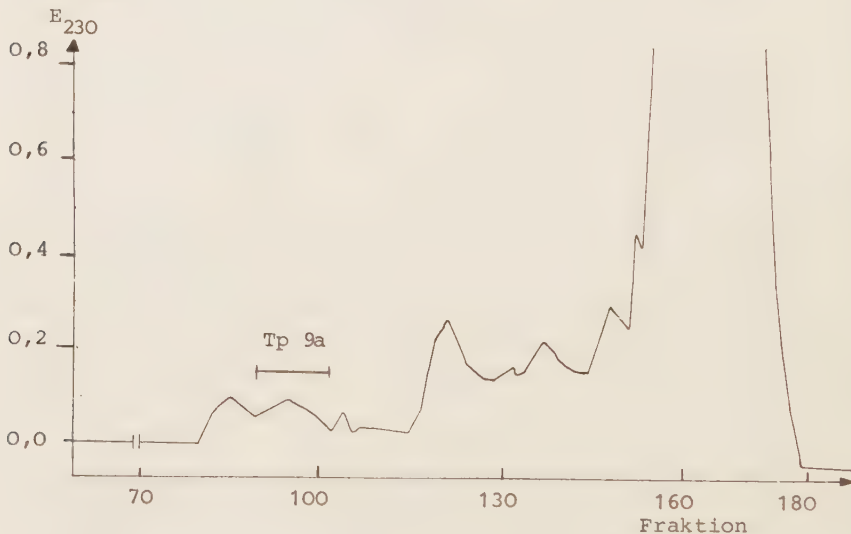
Gelfiltration der Peptide der α^A - Ketten über Sephadex G-50 fine.

Säule: $\varnothing$ 2,5 x 190 cm, 8 M Harnstoff / 10% Ameisensäure, 5 ml/15 min. Die Zahlen über den Gipfeln geben die darin gefundenen Peptide wieder.

11.5 Tryptische Spaltung der α^A - Ketten und Isolierung der Peptide mittels Gelfiltration

Das tryptische Peptid 9a, Position 62 bis 82, konnte mit HPLC-Umkehrphasenchromatographie nur in geringen Ausbeuten isoliert werden. Um das Peptid in größerer Ausbeute zu gewinnen wurde natives Kettenmaterial tryptisch gespalten und die Peptide durch Gelfiltration getrennt. Gelfiltration siehe Methoden 6.1.1 . Das Elutionsprofil der Trennung ist in Diagramm 6 dargestellt.

Diagramm 6



Gelfiltration der tryptischen α^A - Ketten Peptide über Sephadex G-25 fine. Säule: $\varnothing$ 2,5 x 190 cm, 0,1 N Essigsäure, 6 ml/15 min.

Zur tryptischen Spaltung wurden 0,75 μ mol nativer α^A - Ketten mit 2,5% TPCK-Trypsin 2 1/4 Stunden lang bei pH 9 und Raumtemperatur gespalten. Ungelöstes Material wurde abzentrifugiert, die gelösten Peptide in einem Volumen von 2 ml auf die Säule aufgetragen.

11.6 Schema der Isolierung der α^A - Ketten-Peptide

Abkürzungen: RP-2 = Trennung der Peptide, nach Oxidation und tryptischer Spaltung, durch HPLC an RP-2 LiChrosorb Material.

RP-18= Rechromatographie von Peptiden durch HPLC an RP-18 LiChrosorb Material, die durch RP-2 Material ungenügend getrennt waren.

S-G 25 = Trennung der Peptide, nach tryptischer Spaltung nativer Ketten, mit Sephadex-G 25 fine Material.

S-G 50 = Trennung der Peptide, nach Asp-Pro Spaltung, durch Gelfiltration mit Sephadex G 50 Material.

Tabelle 1

Tp		1	2	3	4	5	6a	6b	7	8	9a	9b	10	11	12	13	14			
RP - 2	X			X	X	X	X			X	X	X		X		X				
RP - 18			X						X	X	X		X				X			
S-G 25												X								
S-G 50															-	X	-	X	-	X

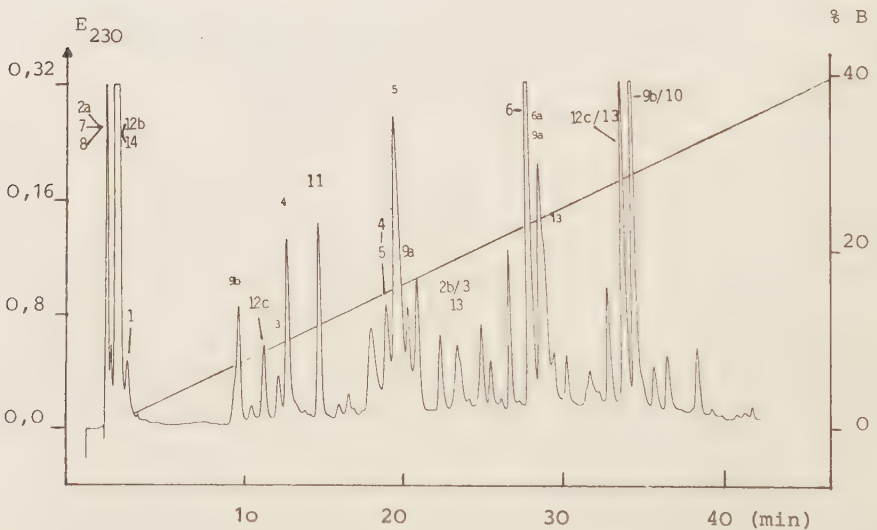
12. Tryptische Spaltung und Isolierung der Peptide der α^D - Ketten

Die Oxidation der α^D - Ketten wurde, wie in Abschnitt 4. der Methoden beschrieben, durchgeführt. Die Spaltung wurde mit Trypsin vorgenommen, wie unter 5.2.1 beschrieben.

12.1 Peptide der α^D - Ketten

12.1.1 Die tryptischen Peptide der α^D - Ketten wurden mittels HPLC über RP-2 LiChrosorb Material isoliert. Puffer: Ammoniumacetat, Lösungsmittelgradient: Acetonitril. Das Elutionsprofil ist in Diagramm 7 dargestellt.

Diagramm 7



Trennung der tryptischen Peptide der α^D - Ketten des Feldsperlings. HPLC, Säule: RP-2, 7 μ m LiChrosorb.

Puffer A: 0,05 M Ammoniumacetat

Puffer B: Acetonitril

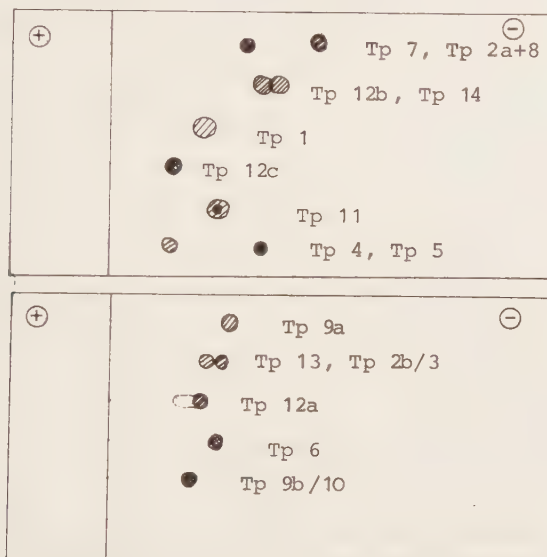
Gradient: Nach einer Minute von 0 auf 40% in 40 Minuten

Flußrate: 2 ml/min.

Gipfel, die mit großen Ziffern bezeichnet sind, enthalten Peptide der α^D - Ketten, Gipfel mit kleinen Ziffern Peptide der α^A -Ketten.

DC - Elektrophorese

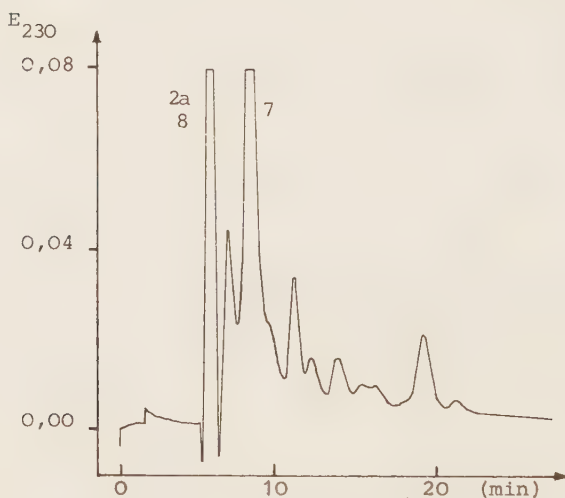
der Gipfelfraktionen der α^D - Peptidtrennung



Wie bereits in Abschnitt Ergebnisse 10. erwähnt, konnten die α^D - Ketten nicht vollkommen rein isoliert werden. Deshalb befanden sich hier sowohl Peptide der α^D - als auch der α^A - Ketten zusammen im Spaltansatz. Aus dem Diagramm 7 ist ersichtlich, daß die Peptide der unterschiedlichen Ketten gut voneinander getrennt eluiert werden konnten. Die Identifizierung der Peptide erfolgte durch Analysen.

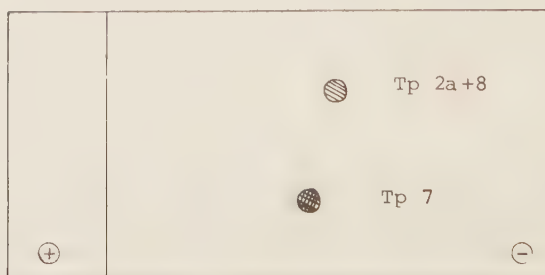
12.2 Peptide der α^D - Ketten, die ungenügend getrennt waren, wurden durch Rechromatographie mit HPLC über Vydac RP-18, 10 μ m Material, isoliert. Puffer: Trifluoressigsäure. Diagramm 8 gibt das Elutionsprofil der Nachtrennung der Peptide aus den großen Anfangsgipfeln des HPLC-Laufes über RP-2 Material (siehe Diagramm 7) wieder.

Diagramm 8



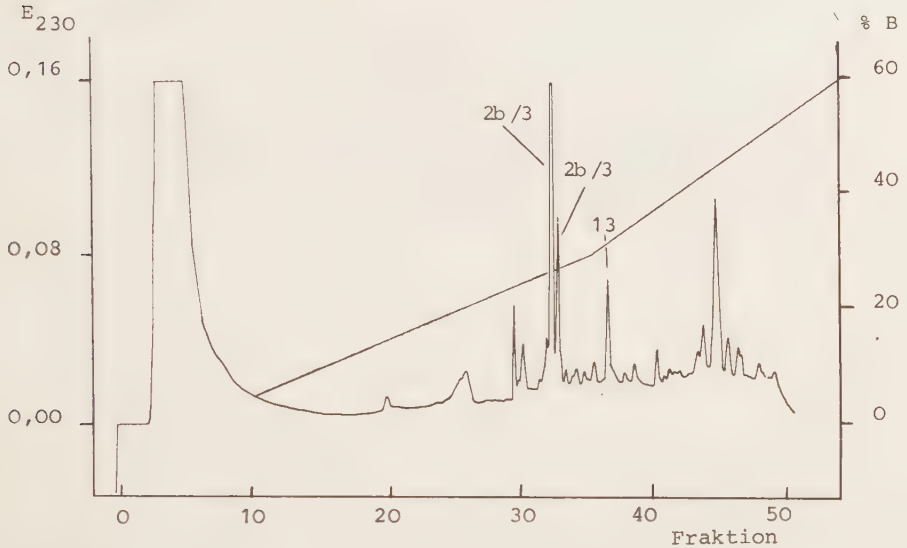
Trennung der Peptide der Anfangsgipfel aus Diagramm 7.
HPLC, Säule: Vydac RP-18, 10 μm ; Puffer: 0,1% TFA,
isokratisch. Flußrate: 1 ml/min.

DC- Elektrophorese



12.3 Die Gipfelfraktion der HPLC - RP-2 Trennung (Diagramm 7), die Tp 2b/3 und Tp 13 gemeinsam enthielt, wurde mittels HPLC über Vydac RP-18 Material nachgetrennt. Der Verlauf der Trennung ist in Diagramm 9 wiedergegeben.

Diagramm 9



Rechromatographie der tryptischen Peptide 2b/3 und 13
HPLC, Säule: Vydac RP-18, 10 μ m.

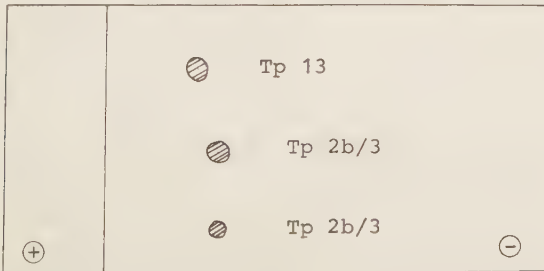
Puffer A : 0,1% TFA

Puffer B : Acetonitril

Gradient : Nach 5 Minuten von 0 auf 30% B in 30 Minuten.

Nach 35 Minuten von 30 auf 60% in 10 Minuten.

DC- Elektrophorese



Die Peptide wurden durch Aminosäureanalysen identifiziert. Das Peptid 2b/3 konnte in 2 Gipfeln nachgewiesen werden. Diese Aufspaltung wird wahrscheinlich durch oxidativen Abbau eines Teils des in diesem Peptid enthaltenen Tryptophans verursacht. Das Peptid liegt in verschiedenen Zustandsformen vor, mit und ohne verändertem Tryptophan, und wird deshalb getrennt eluiert.

Im Gegensatz zu den α^A - und β - Ketten konnten bereits nach der tryptischen Spaltung alle Peptide isoliert, sequenziert und zugeordnet werden.

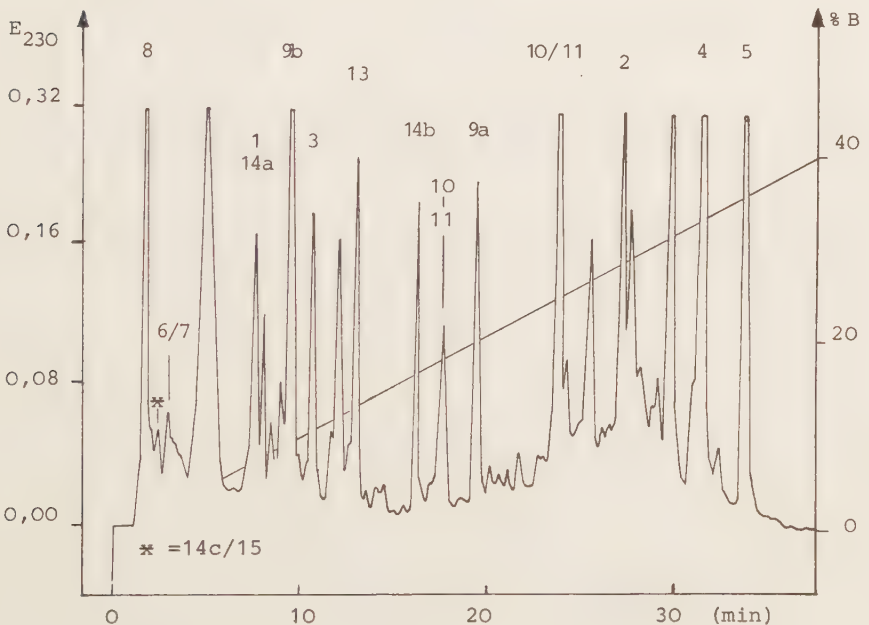
13. Peptide der β - Ketten des Feldsperlings

13.1 Die Oxidation der β - Ketten erfolgte wie in Abschnitt 4. der Methoden beschrieben. Die Spaltung der oxidierten Ketten wurde mit TPCK-Trypsin wie unter 5.3.1 beschrieben, ausgeführt.

13.2 Isolierung der tryptischen Peptide

Die Peptide aus der vorangegangenen tryptischen Spaltung wurde mittels HPLC über RP-2 Material getrennt. Puffer: Ammoniumacetat, Gradient: Acetonitril. Der Verlauf der Trennung ist in Diagramm 10 wiedergegeben.

Diagramm 10



HPLC, Säule: RP-2, LiChrosorb 7 μ m

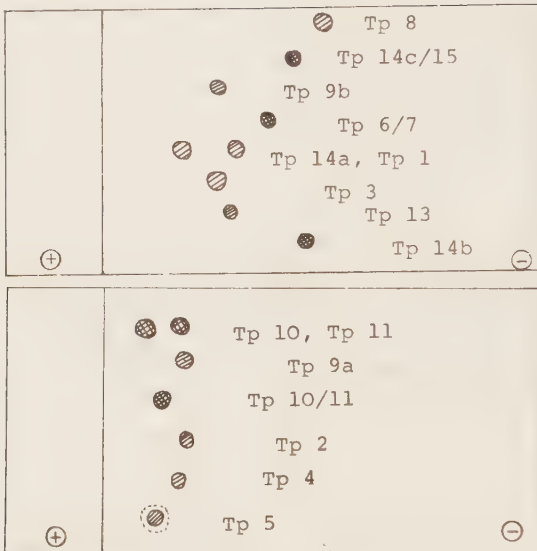
Puffer A : 0,05 M Ammoniumacetat

Puffer B : Acetonitril

Gradient : Nach 1 Minute von 0 auf 40% in 40 Minuten.

Flußrate : 2 ml/Minute

DC- Elektrophorese



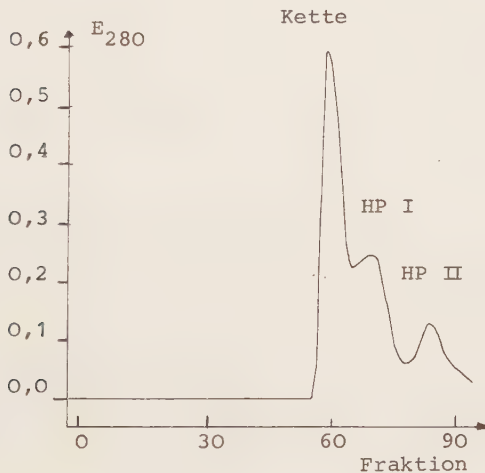
DC- Elektrophorese der Gipfelfraktionen aus Diagramm 10, tryptische Peptide der β - Ketten des Feldsperlings.

Mit dieser Trennung konnten mit Ausnahme von Tp 12 alle tryptischen Peptide isoliert werden. Die Peptide Tp 10 und Tp 11 konnten einzeln, aber auch ungespalten als ditryptisches Peptid Tp 10/11 isoliert werden.

13.3 Säurehydrolytische Spaltung der Asp-Pro Sequenz der β - Ketten

Die Sequenz von Position 105 bis 120 (entspricht Tp 12) wurde am C-terminalen hydrolytischen Peptid II (HP II) ermittelt. Die Spaltung erfolgte wie in Abschnitt 5.3.2 der Methoden beschrieben. Der Verlauf der Trennung mittels Gelchromatographie ist in Diagramm 11 wiedergegeben.

Diagramm 11



Trennung der Peptide nach Asp-Pro Spaltung der β - Ketten des Feldsperlings

Trennmaterial : Sephadex G 50 fine

Säule : 2,5 x 190 cm

Eluens : 8 M Harnstoff/ 10% Ameisensäure

Flußrate : 20 ml/ Stunde

14. Sequenzanalyse

Der sequenzanalytische Abbau der Ketten wie auch der Peptide nach Edman-Begg ist in Abschnitt 8. der Methoden beschrieben.

Der N-terminale Bereich wurde bei der α^A - Kette bis zur Überlappung mit Tp 5 (34 Schritte), bei der α^D - Kette bis zur Überlappung mit Tp 6 (42 Schritte) und bei der β - Kette bis zur Überlappung mit Tp 5 (42 Schritte) sequenziert und durch die Analysen der isolierten Peptide Tp 1 - Tp 4 bzw. Tp 5 bestätigt.

Die Positionen 100 - 122 (Tp 12) der α^A - Kette wurden durch die Sequenzierung des Pro-Peptids (34 Schritte) belegt.

Die Positionen 105 - 120 (Tp 12) der β - Kette wurden durch die Sequenzierung des Pro-Peptids (21 Schritte) belegt.

Die Analysen für die drei Ketten sind in den Tabellen II, III und IV aufgelistet. Die vollständige Sequenz des Feldsperlinghämoglobins ist in den Abbildungen 1 und 2 wiedergegeben.

Die Sequenzen der α^A - und β - Ketten werden in homologem Vergleich der α^A - und β - Ketten des Grauganshämoglobins gegenübergestellt. Nur die von der Sequenz des Feldsperlings abweichenden Aminosäurereste der Grauganssequenz sind dargestellt.

Die Sequenz der α^D - Kette des Feldsperlings wird mit der α^D - Kette des Fasans verglichen.

Analysen der tryptischen Peptide der Globin α^A - Ketten
des Feldsperlings (Passer montanus)

Pos	Tp1 1-7	Tp2 8-11	Tp3 12-16	Tp4 17-31	Tp5 32-40	Tp6a 41-50	Tp6b 51-56	Tp7 57-60	Tp8 61	Tp9a 62-82	Tp9b 83-90	Tp10 91-92	Tp11 93-99	Tp12 100-127	Tp13 128-139	Tp14 140-141
Asx	0.98	1.06		1.09		0.86				3.62(4)	0.99		1.99	(2)		
Thr					1.73(2)	0.81								(2)	1.75	
Ser	0.98	0.76(1)					0.71(1)			1.01	0.98					
Glx				3.95	1.36(1)		0.97			1.03	1.14			(2)		
Pro	0.95				1.02	0.88							0.98	(3)		
Gly			1.18	3.09		1.07	1.12	2.27(2)		1.21(1)				(2)	1.36(1)	
Ala	0.95		1.01	2.97	1.32(1)		1.08			5.22(6)	0.95			(3)	1.92	
Val	0.81	0.94	0.85				0.64(1)			2.56(3)			1.87	(4)	1.67(2)	
Met					0.79(1)											
Ile				0.85						0.88						
Leu	1.01			1.16		1.02				3.16	2.06	1.19		(6)	2.15	
Tyr				0.93	0.74	0.71(1)										1.03
Phe			0.90		0.94	1.67(2)								(1)	0.92	
Lys	1.07	0.99	1.06		1.11	0.91	1.48(1)	0.99	0.94	1.24(1)	0.90		1.03	(1)	1.05	
His						1.09		0.98			1.06			(1)		
Arg				0.96							0.83					0.99
Cys														(1)	1.15	
Summe	7	4	5	15	9	10	6	4	1	21	8	2	7	(28)	12	2

Analysen der tryptischen Peptide der Globin α^D - Ketten
des Feldsperlings (*Passer montanus*)

Pos	Tp1 1-7	Tp2a 8	Tp2b/3 9-16	Tp4 17-31	Tp5 32-40	Tp6 41-56	Tp7 57-60	Tp8 61	Tp9a 62-71	Tp9b/10 72-92	Tp11 93-99	Tp12a 100-112	Tp12b 113-115	Tp12c 116-127	Tp13 128	Tp14 139	140-141
Asx	0.87		1.26 (1)		2.02			1.06	4.87(5)	2.07				1.23 (1)			
Thr	1.00			0.92	0.91						0.92						
Ser				1.77	2.00			1.07	2.95		1.92		1.84	1.84			
Glx	0.95		2.09	2.97	1.96				2.14		2.07		2.02	1.14			
Pro				1.00	1.03					1.09			0.86				
Gly			1.22(1)	3.02	1.15	2.07						0.99					
Ala	0.89			3.04				2.78	2.27(2)		1.05		1.53(1)	2.64(3)			
Val								1.14(2)		1.84	1.02		1.87	1.97			
Met	0.84				0.60(1)										1.01		
Ile			1.78	0.87	1.02			1.01									
Leu	1.01		0.96	1.92	0.97			0.83	6.00	0.93	3.07	1.08			1.00		
Tyr					0.81	0.96							0.77			0.84	
Phe					1.50(1)	1.98				0.98	0.94						
Lys	1.43(1)	1	0.92		1.37(1)	1.00	1	1.09	1.02			0.91	1.03	0.86			
His					1.25(1)	0.97	0.92		0.89				0.82				
Arg			0.82			0.97			0.93		0.97					1.16	
Cys											1.02						
Trp			(1)	(1)													
Sum	7	1	8	15	9	16	4	1	10	21	7	13	3	12	12	2	2

Tabelle IV

Analysen der tryptischen Peptide der Globin β - Ketten
des Feldsperlings (*Passer montanus*)

Pos	Tp1 1-8	Tp2 9-17	Tp3 18-30	Tp4 31-40	Tp5 41-59	Tp6/7 60-65	Tp8 66	Tp9a 67-76	Tp9b 77-82	Tp10 83-95	Tp11 96-104	Tp12 105-120	Tp13 121-132	Tp14a 133-135	Tp14b 136-143	Tp14c/15 144-146
Asx		1.08			1.92				1.90	1.78	1.78	(1)	1.85			
Thr	0.96	0.99		1.03	0.95			1.00		1.04			0.87			
Ser					2.75(3)			0.91	0.95	1.82						
Glx	2.79	1.51(1)	2.07	1.32		1-14		1.13		2.13	1.07		2.36(2)			
Pro				0.89	2.08						0.76		0.61(1)			
Gly		1.73	1.98		2.06	0.99		0.99				(2)				
Ala	1.05		2.83		2.01	1.00		1.05				(2)	2.46(2)	3.20		
Val	1.00		1.94	0.92	1.14	0.86		1.79			1.16	(3)	0.82	1.23(2)		
Met																
Ile	0.82			0.78					0.82			(1)				
Leu	2.03		1.14	2.15	2.29(2)			1.07	1.17	2.14	1.07	(4)		1.18	1.29(1)	0.88
Tyr				0.95												
Phe					2.80			0.95		0.96	0.96	(1)	0.88			
Lys	1.19	0.91			0.99	1.05	1	1.11	1.15	1.18		(1)	0.92			0.97
His						0.95				0.91	0.91	(1)		1.10	1.15	
Arg			1.02	0.96							1.13			1.00	1.17	
Cys			0.92										1.03			
Trp	1	1		1						1.16			1			
Sum	8	9	13	10	19	6	1	10	6	13	9	(16)	12	3	8	3

Homologer Vergleich der α^A - und β -Globinketten des Feldsperlings (*Passer montanus*) und der Graugans (*Anser anser*). Nur die zur Sequenz des Feldsperlings abweichenden Aminosäurereste der Graugans sind dargestellt.

Homologer Vergleich der α^A - und β -Globinketten des Feldsperlings (*Passer montanus*) und der Graugans (*Anser anser*). Nur die zur Sequenz des Feldsperlings abweichenden Aminosäurereste der Graugans sind dargestellt.

A		AB		B	
Fa ad	Asn				
Sp ad	Met-Leu-Thr-Ala-Glu-Asp-Lys-Lys-Leu-Ile-Gln-Ile-Trp-Gly-Lys-Leu-Gly-Ala-Ser-His-Gln-Gln	Ala	Glu	Ala-Ala-Ser-His-Gln-Gln	Phe
		10			20
					30
					Val
					30
C					
Fa ad	Thr-Ala	Gln			
Sp ad	Arg-Met-Phe-His-Ser-Tyr-Pro-Ser-Thr-Lys-Thr-Tyr-Phe-Pro-His-Phe-Asp-Leu-Ser-Gln-Gly-Ser-Asp-Gln-Ile-Arg-Gly-His-Gly-Lys-				
		40			50
					60
D					
Fa ad	Leu-Gly	Val			
Sp ad	Lys-Val-Val-Ala-Ala-Leu-Ser-Asn-Ala-Ile-Lys-Asn-Leu-Asp-Asn-Leu-Ser-Gln-Ala-Leu-Ser-Glu-Ser-Ala-Leu-His-Ala-Tyr-Asn-				
		70			80
					90
E					
Fa ad					
Sp ad					
F					
Fa ad					
Sp ad					
G					
Fa ad					
Sp ad					
H					
Fa ad					
Sp ad					
I					
Fa ad					
Sp ad					
J					
Fa ad					
Sp ad					
K					
Fa ad					
Sp ad					
L					
Fa ad					
Sp ad					
M					
Fa ad					
Sp ad					
N					
Fa ad					
Sp ad					
O					
Fa ad					
Sp ad					
P					
Fa ad					
Sp ad					
Q					
Fa ad					
Sp ad					
R					
Fa ad					
Sp ad					
S					
Fa ad					
Sp ad					
T					
Fa ad					
Sp ad					
U					
Fa ad					
Sp ad					
V					
Fa ad					
Sp ad					
W					
Fa ad					
Sp ad					
X					
Fa ad					
Sp ad					
Y					
Fa ad					
Sp ad					
Z					
Fa ad					
Sp ad					

Die Sequenz der α^D - Ketten aus Hb D des Feldsperlings (Passer montanus)
 Die zu der Sequenz des Feldsperlings abweichenden Aminosäurereste des
 Fasans (Phasianus colchicus colchicus) sind dargestellt.

Das Hämoglobin des Araukanerhuhns
(Gallus gallus, forma araucana)

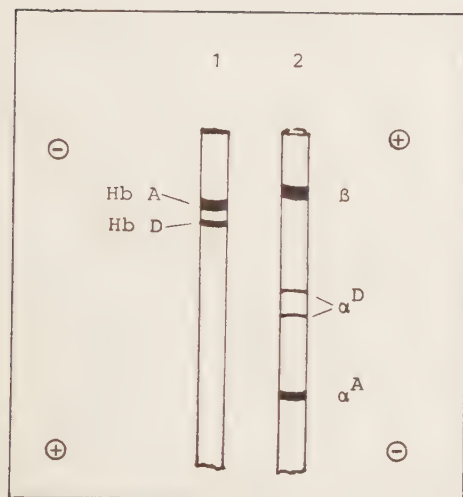
Bei der Untersuchung des Hämoglobins des Araukanerhuhns wurde jeweils parallel dazu, unter gleichen Bedingungen, das Hämoglobin des Leghorn-A Huhns (Zuchtform von Gallus gallus) untersucht. Die Ergebnisse der Versuche mit dem Leghornhämoglobin, dessen Aminosäuresequenz bekannt ist (53-56), konnten damit als Grundlage für Vergleiche dienen.

15. Gewinnung und Bearbeitung des Blutes des Araukanerhuhns

Das Blut stammte von adulten Tieren. Die Entnahme erfolgte wie in Abschnitt 1.2.1 der Methoden beschrieben. Die Hämolyse wurde, wie in Abschnitt 1.2.2 beschrieben, durchgeführt. Die Hämabspaltung geschah durch saure Acetonfällung (siehe 1.1.3)

- 15.1 Die Hämoglobinkomponenten wurden durch eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt. Unter nativen Bedingungen sind zwei Banden zu erkennen, die zwei Komponenten entsprechen, Hb A und Hb D. (Bild 3 links). Analytisch wurden die Globinketten des Gesamthämolysates durch Triton-Gelelektrophorese bestimmt. Es ergaben sich vier Banden. Die β -Ketten wanderten als einheitliche Bande am langsamsten, die α^A -Ketten am weitesten. Die α^D -Ketten spalteten in zwei Banden auf, die zwischen den Banden der beiden anderen Ketten liegen. Nach den Analysen sind die α^D -Ketten aber dennoch einheitlich (Bild 3, rechts).

Bild 3



Polyacrylamid- Gelelektrophorese

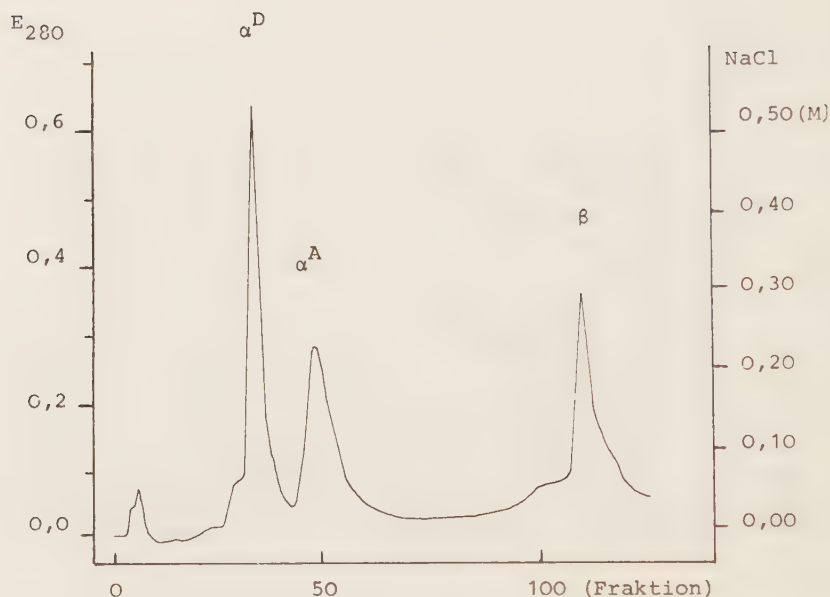
Gel 1: Native Bedingungen, 10%iges Gel, Auftragsmenge: 50 µg Hb. Die Banden sind einheitlich.

Gel 2: Denaturierende Bedingungen, 12%iges Gel, Auftragsmenge: 50 µg Hb. Die Banden der α^A- und der β-Ketten sind einheitlich, die der α^D-Ketten spalten auf.

16. Kettentrennung

Die Trennung der Globinketten wurde an Carboxymethylcellulose vorgenommen. Die α^D- Ketten wurden als erste eluiert, danach die α^A- Ketten und zuletzt die β-Ketten. Alle Ketten waren einheitlich. Das Elutionsprofil der Trennung ist in Diagramm 12 wiedergegeben.

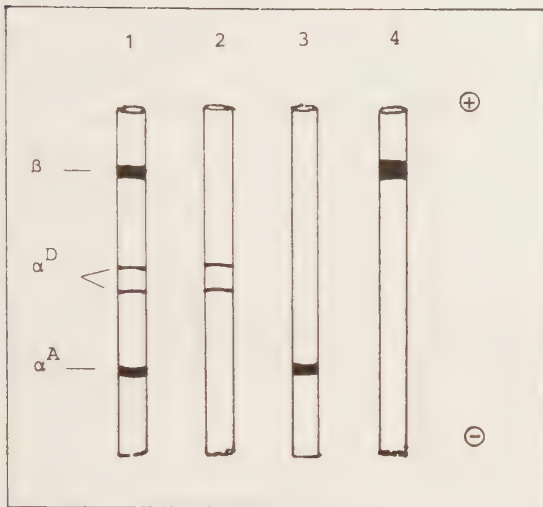
Diagramm 12



Kettentrennung des Araucanerhuhn-Globins über CM-Cellulose
 Säule : $\varnothing$ 2,5 x 15 cm
 Puffer : 0,02 M Natriumacetat, pH 5,4, 8 M Harnstoff,
 0,2 % Mercaptoethanol
 Gradient : 1. 0,00 - 0,10 M NaCl 300 ml logarithmisch
 2. 0,10 - 0,20 M NaCl 350 ml linear
 3. 0,20 - 0,50 M NaCl 150 ml logarithmisch
 Flußrate : 40 ml / Stunde
 Probe : 300 mg Globin in 40 ml Puffer

Die Reinheit der Ketten wurde in der denaturierenden Elektrophorese überprüft (siehe Bild 4). α^A - und β - Ketten ergeben jeweils eine Bande, die α^D - Ketten spalten in zwei Banden auf. Die Ketten sind einheitlich.

Bild 4



Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Gipfelfractionen
der Kettentrennung (Diagramm 12)

Denaturierende Bedingungen, pH 2,5, 12%iges Gel

Gel 1 : 30 μ g Gesamthämoglobin

Gel 2 : 30 μ g aus dem ersten Gipfel = α^D - Kette

Gel 3 : 30 μ g aus dem zweiten Gipfel = α^A - Kette

Gel 4 : 30 μ g aus dem dritten Gipfel = β - Kette

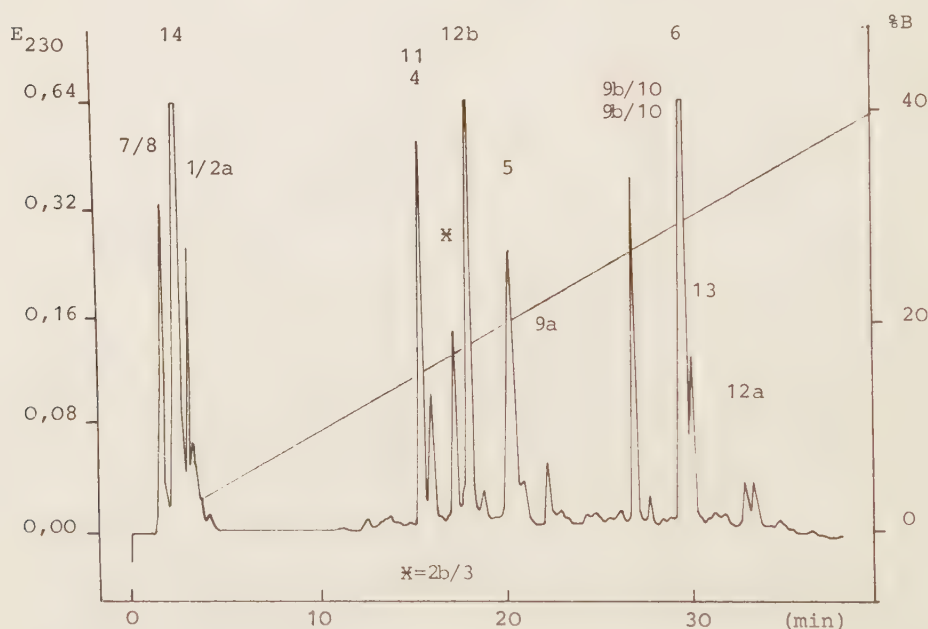
17. Tryptische Spaltung und Isolierung der α^D - Ketten Peptide

17.1 Die Oxidation der α^D - Ketten erfolgte wie in Abschnitt 4
der Methoden beschrieben. Die Spaltung wurde, wie in Ab-
schnitt 5.5.1 beschrieben, mit TPCK-Trypsin durchgeführt.

17.2 Peptide der α^D - Ketten

Die Isolierung der α^D - Ketten erfolgte mittels HPLC an RP-2 LiChrosorb Material. Puffer: Ammoniumacetat, Lösungsmittelgradient: Acetonitril. Das Elutionsprofil der Trennung ist in Diagramm 13 dargestellt. Die Zahlen über den Gipfeln bezeichnen die darin gefundenen tryptischen Peptide. Die Peptide wurden durch Analysen identifiziert.

Diagramm 13



Trennung der tryptischen Peptide der α^D - Ketten des Araukanerhuhns

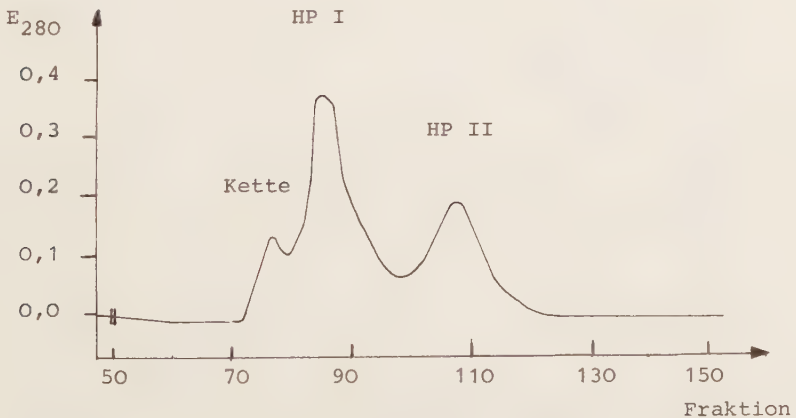
HPLC, Säule: RP-2, 7 μ m LiChrosorb, Puffer A: 0,05 M Ammoniumacetat, pH 6, Puffer B: Acetonitril, Gradient: Nach einer Minute von 0% auf 40% B in 40 Min. Flußrate: 2 ml / min.

Mit dieser Trennung konnten alle tryptischen Peptide isoliert werden. Die Identifizierung der Peptide erfolgte durch Analysen. Die Bruttoformeln der Analysen sind, mit Ausnahme von Tp 12a, dessen Analysenwerte nicht eindeutig waren, in Tabelle V aufgelistet.

17.3 Säurehydrolytische Spaltung der Asp-Pro Sequenz der α^D - Kette

Die Sequenz von Position 100 bis 115 (entspricht Tp 12a) wurde am C-terminalen hydrolytischen Peptid II (HP II) ermittelt. Die Spaltung erfolgte gleich der in Abschnitt 5.3.2 der Methoden beschriebenen Spaltung. Der Verlauf der Trennung mittels Gelchromatographie ist in Diagramm 14 wiedergegeben.

Diagramm 14



Trennung der Peptide nach Asp-Pro Spaltung der α^D - Ketten des Araukanerhuhns

Trennmateriel : Sephadex G-50 fine

Säule : Ø 2,5 x 190 cm

Eluens : 8 M Harnstoff/10% Ameisensäure

Flußrate : 20 ml / Stunde

Fraktionen : 5 ml / 15 min

Tabelle V

Bruttoformeln der tryptischen Peptide der Globin α^D - Ketten
des Araukanerhuhns (Gallus gallus, forma araucana)

Pos	Tp1/2a	Tp2b/3	Tp4	Tp5	Tp6	Tp7/8	Tp9a	Tp9b/10	Tp11	Tp12a	Tp12b	Tp13	Tp14
	1-8	9-16	17-31	32-40	41-56	57-61	62-71	72-92	93-99	100-115	116-127	128-139	140-141
Asx	1.10				1.62(2)		1.05	5.27	1.95		1.69		
Thr	0.91		0.99	2.78	0.94						0.91		
Ser			1.11		1.97			1.91		(1)		2.06	
Glx	1.25	2.88	4.02	1.14	0.93			2.26		(2)	1.19	1.21	
Pro				(1)	1.75				1.06		(1)		
Gly			1.05		1.20	2.19	2.23			(1)			
Ala	1.10	1.05	3.61(4)				1.91	2.72		(1)	1.67	2.82	
Val					0.89		1.72	1.08	1.85	(3)	0.80	1.91	
Met	0.79			0.91						(1)			
Ile		0.95								(1)			
Leu	1.21	1.18	1.06		1.08		2.08	4.01		(3)		2.25	
Tyr				0.99	0.91			1.06			1.27		0.69
Phe			0.94	1.01	1.97				0.94		1.09	0.99	
Lys	1.66	0.92		1.14		2.01	1.02		1.09	(1)	1.01	0.97	
His			0.98		1.04	0.80		1.13		(1)	1.39		
Arg			0.93		0.97			1.03					1.32
Cys													
Trp		(1)								(1)			
Sum	8	8	15	9	16	5	10	20	7	16	12	12	2

18. Tryptische Spaltung und Trennung der Peptide der α^A -Ketten

18.1 Die Oxidation der α^A - Ketten erfolgte wie in Abschnitt 4 der Methoden beschrieben. Die Spaltung wurde mit TPCK-Trypsin durchgeführt, wie unter 5.4.1 beschrieben.

18.2 Isolierung der Peptide der α^A - Ketten

Die Peptide der α^A - Ketten des Leghorn- und des Araukanerhuhnhamoglobins wurden unter weitestgehend identischen Bedingungen, parallel bearbeitet.

Die Isolierung der Peptide erfolgte mittels HPLC an RP-2 LiChrosorb Material. Puffer: Ammoniumacetat, Lösungsmittelgradient: Acetonitril. Die Elutionsprofile der Trennungen sind in den Diagrammen 15 und 16 gegenübergestellt.

Bedingungen der Trennungen:

HPLC, Säule : RP-2 LiChrosorb
Puffer A : 0,05 M Ammoniumacetat,
pH 6
Puffer B : Acetonitril
Gradient : Nach einer Minute von 0%
auf 40% B in 40 Minuten
Flußrate : 2 ml / min

Die Elutionsprofile weisen ein hohes Maß an Übereinstimmung auf. Die Zahlen über den Gipfeln sind die Retentionszeiten der Peptide. Unterschiede der Retentionszeiten liegen im 1/10 Sekunden Bereich und haben ihre Ursache in unterschiedlicher Dauer der Äquilibration der Trennsäule.

Diagramm 15

Trennung der tryptischen Peptide der α^A - Ketten des Araukanerhuhns

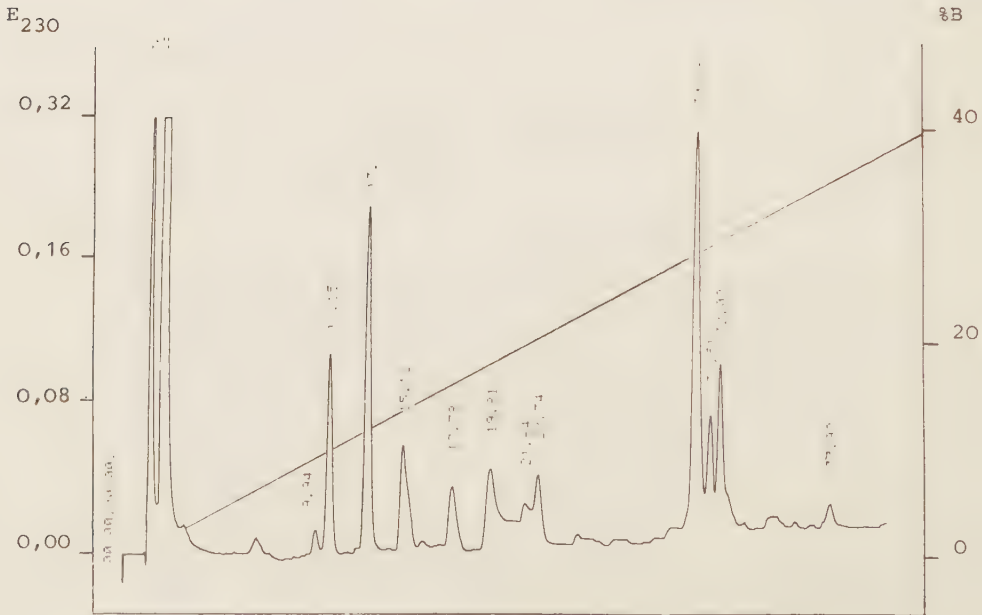
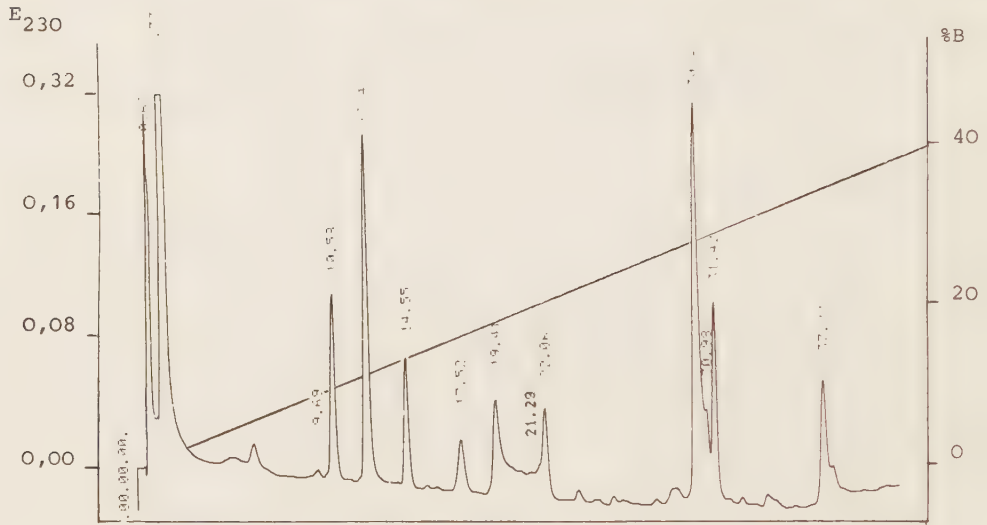


Diagramm 16

Trennung der tryptischen Peptide der α^A - Ketten des Leghornhuhns

18.3 Analysen

Die Aminosäureanalysen und der sequenzanalytische Abbau der Ketten sind in den Abschnitten 7 und 8 der Methoden beschrieben.

Der N-terminale Bereich der α^D - Kette wurde bis zur Überlappung mit Tp 6 (42 Schritte) sequenziert. Vom Pro-Peptid , Position 95 - 141, wurden 21 Schritte (beinhaltet Tp 12a) sequenziert. Die Aminosäuren aller Peptide der α^D - Kette wurden durch Analysen identifiziert. Unterschiede zur bekannten Sequenz des Leghorn-A Huhns konnten nicht gefunden werden.

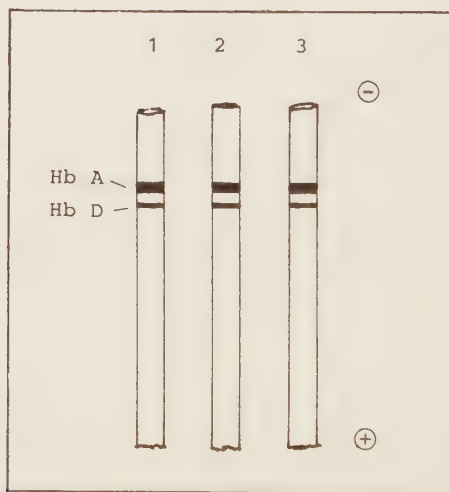
Die α^A - Ketten von Leghorn-A und Araukanerhuhn wurden, wie oben bereits dargestellt, parallel unter gleichen Bedingungen untersucht. Bereits die Elutionsprofile der Peptidtrennungen wiesen ein sehr hohes Maß an Übereinstimmung auf. Diese Übereinstimmung läßt den Schluß zu, daß zwischen den Ketten der beiden Hühner-rassen keine signifikanten Unterschiede zu erwarten sind.

Das Hämoglobin des Bankivahuhns (*Gallus gallus* (L., 1758))

19. Das Blut stammte von adulten Tieren. Die Blutentnahme erfolgte wie in Abschnitt 1.2.1 der Methoden beschrieben. Die-Hämolyse wurde wie in Abschnitt 1.2.2 beschrieben durchgeführt. Die Hämabspaltung geschah durch Fällung in saurem Aceton (siehe 1.1.3).

19.1 Die Hämoglobinkomponenten wurden durch eine Polyacrylamid-Elektrophorese bestimmt. Unter nativen Bedingungen sind zwei Banden zu erkennen, entsprechend den zwei Komponenten Hb A und Hb D. (Bild 5, 1)

Bild 5



Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen
10%iges Gel, Auftragsmenge: Je 50 µg Hb,
Die Banden sind einheitlich.

Vergleichende Darstellung der Untersuchung der Hämoglobinkomponenten von :

- 1 = Bankivahuhn
- 2 = Araukanerhuhn
- 3 = Leghorn-A Huhn

V. D I S K U S S I O N

Der Feldsperling (*Passer montanus*) gehört zur Ordnung der Sperlingsvögel (*Passeriformes*), Unterordnung Singvögel (*Oscines*), Familie Weibervögel (*Ploceidae*), Unterfamilie Sperlinge (*Passerinae*), Gattung Sperlinge i.e.S. (*Passer*) (57).

Er ist über Europa und Asien verbreitet, vereinzelt kommt er auch in Nordafrika vor. In Europa lebt er in Gärten, Feldern und an Waldrändern, im Gegensatz zum Haussperling (*Passer domesticus*), der sich dem Menschen näher anschließt. In Asien nimmt er die Stelle des Haussperlings ein (58).

Aus dem Blut des adulten Feldsperlings wurden zwei Hämoglobine isoliert. Die Hauptkomponente mit den α^A -Ketten entspricht $\approx 85\%$, die Nebekomponente mit den α^D -Ketten $\approx 15\%$ des Gesamthämoglobins . Die β -Ketten sind in beiden Komponenten identisch. Das Verhältnis Haupt- zu Nebekomponente ist 5,6 : 1 .

Sequenzen der Ketten

Die Primärstrukturen der α^A -, α^D - und β -Ketten sind in den Abbildungen 1 und 2 wiedergegeben. Die Sequenzen der α^A - und β -Ketten sind in der Abbildung 1 homolog gegenübergestellt und die Unterschiede zu den entsprechenden Ketten des Hämoglobins der Graugans (45) angegeben. Die Sequenzen der Globinketten der Graugans (*Anser anser*) wurden zum Vergleich gewählt, da sie die ersten, vollständigen und korrekten Sequenzanalysen eines Vogelhämoglobins darstellen. Die Sequenz der α^D - Ketten des Feldsperlings ist in Abbildung 2 mit den α^D - Ketten des Fasans (46) verglichen. Die α^D - Kette des Fasans (*Phasianus colchicus colchicus*) ist die erste α^D - Kette deren Aminosäuresequenz aufgeklärt wurde. (Die α^D - Ketten der Graugans wurden bisher nicht untersucht),

Hämoglobin-Phosphat-Wechselwirkung

Organische Phosphate senken als allosterische Effektoren die Sauerstoffaffinität tetramerer Hämoglobine (13). Polyphosphate schieben sich zwischen die β -Ketten, bilden Wasserstoffbrücken und stabilisieren damit die T-Struktur des Hämoglobinmoleküls. Die Bindungsstellen des Phosphats am Hämoglobin der Vögel wurden durch die Röntgenstrukturanalyse des Humanhämoglobins und den Vergleich mit der β -Kettensequenz des Huhns bestimmt (11). Bei Säugern wirkt 2,3-DPG als Effektor. Strukturanalysen des adulten Humanhämoglobins klärten die folgenden Bindungsstellen auf: NA1 (1) β Val, NA2 (2) β His, EF6 (82) β Lys, H21 (143) β His (11). Bei Vögeln wirkt IPP als allosterischer Effektor. Die Bindungsstellen sind die gleichen wie bei den Säugern, jedoch ist H21 (143) β His durch Arg ersetzt, NA2 (2) β kann durch Gln ersetzt sein und mit H13 (135) β Arg und H17 (139) β His sorgen zwei zusätzliche Bindungsstellen für eine Kompensation negativer Ladungen (59). Die Sequenzanalyse der β -Ketten des Feldsperlings klärt auf, daß die IPP Bindungsstellen denen der übrigen bisher untersuchten Vögel gleichen. NA2 (2) β His ist wie auch bei Strauß (52), Nandu (52) und Star (2) durch Gln ersetzt. Derselbe Austausch findet sich auch in den β -Ketten des Pferdes (25). Die Bindung von IPP an geladenes Histidin ist stärker als die Wasserstoffbrückenbindung mit Glutamin (60). Die schwächere Bindung hat eine Erhöhung der Sauerstoffaffinität zur Folge. Es beeinflussen jedoch auch andere Parameter die Sauerstoffaffinität. Physiologische Messungen am Blut des Feldsperlings liegen nicht vor, es erscheint jedoch zulässig, die Werte, die für den Haussperling gefunden wurden, zu übertragen (61).

Der Sauerstoffdruck, der zur Halbsättigung des Sperlingsblutes nötig ist, beträgt 41,3 (mm Hg), (Huhn $P_{50} - O_2$ 35,1 mm Hg, Nandu $P_{50} - O_2$ 20,7 mm Hg). Die Sauerstoffaffinität des Sperlingsblutes ist also relativ niedrig. Nach der Bestimmung dieser Werte bei mehreren Vogelarten läßt sich feststellen, daß die Beobachtung, Tiere mit hohem Körpergewicht haben eine höhere Sauerstoffaffinität des Blutes ($P_{50} - O_2$ ist niedriger), sowohl für Säuger als auch für Vögel zutreffen dürfte.

Vergleichende Untersuchung der Aminosäuresequenzen der Globinketten des Feldsperlings

Die Summe der Aminosäureaustausche und der minimalen Nukleotidaustausche, die dafür nötig sind, sind in Tabelle VI dargestellt. Verglichen wurden jeweils die Unterschiede der Feldsperlingssequenz zur Sequenz der entsprechenden Ketten anderer Vogelarten und zur Sequenz des Humanhämoglobins. Da einige Aminosäureaustausche auf die Mutation von zwei Nukleotiden zurückgeführt werden muß, ergeben sich unterschiedliche Summen der Aminosäure- und Nukleotidaustausche der gleichen Ketten.

Tabelle VI

	Aminosäuren- austausche			Nucleotid- austausche		
	Ketten			Ketten		
	β	α^A	α^D	β	α^A	α^D
Feldsperling						
Star	2	15	8	2	15	8
Graugans	16	22	/	16	25	/
Huhn	12	25	35	13	27	44
Fasan	13	24	34	16	29	42
Moschus- ente	12	23	34	13	28	41
Nandu	12	25	32	12	32	44
Steinadler	14	27	31	15	33	42
Flamingo	14	31	/	15	37	/
Strauß	15	28	36	17	35	46
Mensch	42	43	/	56	56	/
Huhn/Fasan	2	5	7	2	6	8

Feldsperling (*Passer montanus*), Star (*Sturnus vulgaris*), Graugans (*Anser anser*), Huhn (Leghorn A Zuchtform von *Gallus gallus*), Fasan (*Phasianus colchicus colchicus*), Moschus-ente (*Cairina moschata*), Nandu (*Rhea americana*), Steinadler (*Aquila chrysaetos*), Flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*), Strauß (*Struthio camelus*) (2, 45-56).

Aus der Tabelle VI ist ersichtlich, daß zwischen den Ketten von Star und Feldsperling die wenigsten Unterschiede zu finden sind. Dies entspricht auch der Einordnung dieser beiden Vogelarten in der Systematik der Vögel, in der beide der Ordnung Passeriformes und der Unterordnung Oscines zugeordnet werden (57).

Ein Vergleich der Aminosäureaustauschraten der $\beta : \alpha^A$: α^D - Ketten bei Vögeln, lassen nahezu konstante Verhältnisse von $1 : 2$ ($1,4 - 2,2$) : 3 ($2,2 - 4$) erkennen, entsprechend auch die Verhältnisse der Nukleotidaustausche $1 : 2$ ($1,6 - 2,6$) : 3 ($2,6 - 4$).

Ein Vergleich der Austausche zwischen Fasan und Huhn, die in der Vogelsystematik eine nahe verwandtschaftliche Einordnung erfahren (beide gehören zur Unterfamilie der Phasianinae), zeigt die Verhältnisse $\beta : \alpha^A : \alpha^D$ Ketten $1 : 2,5 : 3,5$ bei den Aminosäureaustauschen und $1 : 3 : 4$ bei den Nukleotidaustauschen. Diese Werte stimmen mit bereits früher gemachten Beobachtungen überein, daß bei Vögeln die β -Ketten die niedrigsten, die α^D - Ketten die höchsten Austauschraten besitzen, und daß die Werte der α^A - Ketten etwa in der Mitte dazwischen liegen (2) . Die Ergebnisse, die sich beim Vergleich der Ketten des Stars und des Feldsperlings ergeben, entsprechen jedoch nicht diesen für allgemein bei den Vögeln für gültig gehaltenen Beobachtungen.

Zwischen den β -Ketten von Feldsperling und Star bestehen 2 Aminosäureaustausche, die durch den minimalen Austausch zweier Nukleotide bedingt sein müssen. Zwischen den β -Ketten von Huhn und Fasan bestehen ebenfalls zwei Austausche. Die β -Ketten haben, wie bei den anderen Vögeln, die niedrigste Mutationsrate. Die α^D - Ketten von Feldsperling und Star unterscheiden sich in 8 Aminosäuren bei minimal 8 Nukleotidaustauschen. Die Austausche der α^D - Ketten von Fasan und Huhn liegen mit 7 Aminosäureunterschieden bei minimal 8 Nukleotidaustauschen in der gleichen Größenordnung.

Die α^A - Ketten von Fasan und Huhn weisen 5 Aminosäure-unterschiede bei minimal 6 Nukleotidaustauschen auf. Auffällig sind die Werte beim Vergleich der α^A - Ketten von Feldsperling und Star. Zwischen diesen Ketten besteht ein Unterschied von 15 Aminosäuren, bei minimal 15 Nukleotidaustauschen. Das Verhältnis $\beta : \alpha^A : \alpha^D$ Ketten ist 1 : 7 : 4 bei den Aminosäureaustauschen, entsprechend 1 : 7,5 : 4 bei den Nukleotidaustauschen. Diese Werte stimmen damit nicht mit den Verhältnissen bei den übrigen Vögeln überein.

Die oben genannten Werte legen den Schluß nahe, daß die Mutationsrate der α^A - Kette im Vergleich Star / Feldsperling am höchsten ist, und nicht wie bei den anderen Vögeln die der α^D - Ketten.

Die Ursache für diesen Sachverhalt bedarf zur Klärung jedoch weiterer Untersuchungen. Es wäre denkbar, daß hier der Beziehung Struktur/Funktion große Bedeutung zukommt. Der Austausch H7 (124) α^A Ser-Pro beim Feldsperling, der in einer internen Position eines Helixbereiches liegt, bedingt mit Sicherheit einen gravierenden Eingriff in die Struktur der Kette und damit in deren Funktion. Möglicherweise sind deshalb eine Anzahl weiterer Austausche nötig, um die Funktion der Kette zu erhalten, was die höhere Mutationsrate erklären könnte. Die Besonderheit des Verhältnisses der α^A - Ketten von Feldsperling und Star wird vor allem deshalb deutlich, weil die beiden Vogelarten relativ nahe verwandt sind und deshalb die Gesamtzahl der Austausche weniger hoch ist. Die Gesamtzahl macht nur etwa 1/3 dessen aus, was im Vergleich zu anderen Vogelarten gefunden wird.

Bei einem Vergleich zahlreicher Aminosäuresequenzen der Globinketten verschiedenster Spezies (Human, Primaten, Säuger, Reptilien, Vögel) fällt auf, daß an bestimmten Positionen sehr häufig, an anderen mehr spezifisch, z.B. vorzugsweise nur bei Vögeln und Reptilien, Austausche auftreten. Bestimmte Positionen sind im Gegensatz dazu konservativ, d.h. dort treten Austausche nur sehr selten auf.

Betrachtet man die Positionen der α^A - Ketten des Feldsperlings, die im Vergleich zu den α^A - Ketten der Graugans unterschiedlich sind, so sind an diesen Positionen im Vergleich zu zahlreichen Spezies

häufig Austausche an Position : 4, 8, 15, 34, 50, 57,
111, 113, 115, 116,

spezifisch Austausche bei

Vögeln und Reptilien

an Position : 28, 35, 49, 55, 100, 103.

Konservativ sind die Positionen : 20, 27, 72, 112, 124.

Die ausgetauschten Positionen zwischen den α^A - Ketten des Feldsperlings und des Stars sind, bedingt durch die näheren verwandtschaftlichen Beziehungen weniger zahlreich. Von diesen Positionen befinden sich

häufig Austausche an Position : 4, 5, 8, 12, 15, 73, 76,
111.

spezifische Austausche bei

Vögeln und Reptilien

an Position : 28.

Konservativ sind die

Positionen : 24, 27, 70, 72, 112, 124.

Der Vergleich der 22 Positionen, die zwischen den α^A - Ketten von Feldsperling und Graugans unterschiedlich sind, zeigt, daß 22,7% der Austausche an konservativen Positionen stattgefunden haben. Bei den 15 Positionen, die zwischen den α^A - Ketten von Feldsperling und Star unterschiedlich sind, beträgt der Anteil der Austausche an konservativen Stellen sogar 40% . Dies deutet darauf hin, daß die α^A - Ketten des Feldsperlings durch Mutationen sehr massiv beeinflußt worden sein müssen, da gerade konservative Stellen verstärkt direkt mit speziellen Funktionen des Moleküls in Verbindung gebracht werden können.

Tabelle VII

Häm - Bindungsstellen

Pos			HU	FS		FS	HU			Pos
			α	α^A	α^D	β	β			
							Leu	B13		31
42	C7	Tyr					Phe	C7		41
43	CD1	Phe					Phe	CD1		42
45	CD3	His								
46	CD4	Phe								
58	E7	His					His	E7		63
61	E10	Lys					Lys	E10		66
62	E11	Val					Val	E11		67
						Ser	Ala	E14		70
83	F4	Leu					Leu	F4		88
86	F7	Leu					Leu	F7		91
87	F8	His					His	F8		92
91	FG3	Leu					Leu	FG3		96
93	FG5	Val					Val	FG5		98
97	G4	Asn					Asn	G4		102
98	G5	Phe					Phe	G5		103
101	G8	Leu					Leu	G8		106
136	H19	Leu					Leu	H19		141

(HU = Human, FS = Feldsperling)

In den α^A - und den α^D - Ketten sind alle Häm-Bindungsstellen unverändert erhalten. In den β - Ketten ist mit Ser E14 (Pos 70) eine Häm-Bindungsstelle gegenüber Human-Hb A (Ala) ausgetauscht. Der Austausch Ala - Ser an dieser Position wird im Vergleich mit den β - Ketten zahlreicher Spezies häufig gefunden. Aus diesem Austausch, dessen Unterschied lediglich in einer zusätzlichen -OH Gruppe bei Serin besteht, scheinen sich keine bedeutenden Konsequenzen für Struktur und Funktion des Hämoglobinmoleküls zu ergeben. Als Beispiel sei im Gegensatz dazu der Austausch Ala - Asp genannt, der an der gleichen Position in einem abnormalen Hämoglobin gefunden wurde. Diese beiden Aminosäuren unterscheiden sich sehr stark voneinander und der Austausch hat eine niedrigere Sauerstoffaffinität und die Destabilisierung des Moleküls zur Folge. (62)

Tabelle VIII

Bindungsstellen der $\alpha_1 - \beta_2$ - Ketten
Deoxy-Hämoglobin

		HU	FS		FS	HU		
Pos		α	α^A	α^D	β	β		Pos
37	C2	Pro				His	HC3	146
38	C3	Thr	Gln	Ser		Tyr	HC2	145
40	C5	Lys				Leu	G7	105
41	C6	Thr				Asn	G4	102
42	C7	Tyr				Glu	G3	101
44	CD2	Pro				Asp	G1	99
88	F9	Ala				Val	FG5	98
91	FG3	Leu				His	FG4	97
92	FG4	Arg			Ala	Glu	CD2	43
94	G1	Asp				Phe	C7	41
95	G2	Pro				Arg	C6	40
96	G3	Val				Trp	C3	37
97	G4	Asn				Pro	C2	36
140	HC2	Tyr				Tyr	C1	35
141	HC3	Arg				Val	B16	34

(HU = Human, FS = Feldsperling)

Von den Aminosäuren, die den $\alpha_1 - \beta_2$ Bindungsbereich formen, ist in den α^A -, α^D - und β -Ketten nur jeweils eine ausgetauscht. Die Substitutionen Thr-Gln α^A b.z.w. Thr-Ser α^D C3 (38), findet man auch in den Globinketten von Fischen, Krokodilen, anderen Vögeln, sowie in den bisher sequenzierten embryonalen ζ -Ketten und den embryonalen π -Ketten des Huhns (63,64). Diese Hämoglobine besitzen alle eine hohe intrinsische Sauerstoffaffinität. Im Human Hb A besteht eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Glu CD2 (43) β und Arg FG4 (92) α . Glu CD2 β ist bei den meisten Vögeln gegen Ala ausgetauscht. Dieser Austausch könnte die Stabilität des tetrameren Moleküls beeinflussen. Der gleiche Austausch wurde bei drei abnormalen Hämoglobinen gefunden (65), hat jedoch keine klinischen Konsequenzen für die Träger.

Tabelle IX

Bindungsstellen der $\alpha_1 - \beta_1$ - Ketten
Deoxy-Hämoglobin

Pos	HU			FS		FS		HU		Pos
	α	α^A	α^D			β		β		
31	B12	Arg						Gln	H9	131
34	B15	Leu	Ala	His				Ala	H6	128
35	B16	Ser	Thr					Gln	H5	127
36	C1	Phe	Tyr	Tyr		Asp		Pro	H3	125
103	G10	His	Gln	Gln				Pro	H2	124
106	G13	Leu						Thr	H1	123
107	G14	Val						Phe	GH5	122
110	G17	Ala						Gly	GH2	119
111	G18	Ala	Thr	Thr		Ala		His	G18	116
114	GH2	Pro		Gly				Ala	G17	115
117	GH5	Phe	Leu	Tyr		Val		Cys	G14	112
118	H1	Thr		Ser		Asp		Asn	G10	108
119	H2	Pro				Leu		Met	D6	55
122	H5	His						Tyr	C1	35
123	H6	Ala		Ser				Val	B16	34
126	H9	Asp				Ile		Val	B15	33
								Arg	B12	30

Im $\alpha_1 - \beta_1$ Bindungsbereich findet man eine große Zahl von Substitutionen. Ob diese Austausche eine Bedeutung für die Funktion des Moleküls haben, ist fraglich, da die $\alpha_1 - \beta_1$ - Kontaktregion beim Übergang zwischen der R- und T- Struktur nur relativ geringe Veränderungen erfährt. Die Einführung zusätzlicher, polarer Gruppen: Tyr C1 (36) und Thr G18 (111) in den α^A - Ketten ; Tyr C1 (36), Thr G18 (111), Tyr GH5 (117) und Ser H6 (123) in den α^D - Ketten, läßt an die Ausbildung zusätzlicher Wasserstoffbrücken denken, so daß im Vergleich zum Humanhämoglobin andere Wasserstoffbrücken zur Stabilität der Dimeren beitragen werden.

Strukturbetrachtungen

M.F. Perutz gelang mit Hilfe der Röntgenbeugungsanalyse 1960 die Aufklärung der Raumstruktur des menschlichen Hämoglobinmoleküls (Hb A) (7). Durch nachfolgende Arbeiten mit verbesserten Arbeitsmethoden gelang es, viele Details noch präziser zu erkennen (66) . Die Raumstrukturaufklärung weiterer Hämoglobine (Pferd, Chironomus (79,67) und des Myoglobins (6) zeigte, daß alle diese sogenannten "respiratorischen Proteine" große Übereinstimmungen in ihren Grundstrukturen aufweisen. Diese Erkenntnis erlaubte es, die Raumstrukturen der Hämoglobine anderer Spezies in vergleichenden Untersuchungen von den bereits bekannten abzuleiten, wenn auch die absolute Richtigkeit der abgeleiteten Strukturen nur durch die Raumstrukturanalyse jedes einzelnen Hämoglobins bewiesen werden kann.

Strukturbetrachtungen der β - Ketten des Feldsperlings

Bei dem Vergleich der β - Ketten des Human- und Feldsperlinghämoglobins findet man 42 Aminosäureaustausche. 37 dieser Austausche befinden sich an Positionen , an denen bei Vögeln, aber auch bei anderen Spezies sehr häufig Austausche vorkommen. 31 der ausgetauschten Aminosäuren liegen an der Moleküloberfläche. An diesen Positionen sollte genügend Raum sein, um auch den veränderten Seitenketten der Aminosäuren Platz zu gewähren, ohne daß dadurch die Struktur des Gesamtmoleküls beeinflußt wird.

Mit den Austauschen His - Gln HA2 (Pos. 2) β und His - Arg H21 (Pos. 143) β sind zwei Phosphatbindungsstellen verändert. Diese Veränderungen können die Steigerung der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins bewirken. Den gleichen Austausch Gln HA2 β findet man auch bei Strauß, Nandu und Star, Arg H21 β findet man bei allen Vögeln (2, 45-56).

Im Gegensatz dazu stehen die Austausche Gly - Asn EF7 (Pos. 83) β und Asn - Asp G10 (Pos. 108) β , die in abnormalen Humanhämoglobinen ebenfalls gefunden wurden, wo sie eine Erniedrigung der Sauerstoffaffinität zur Folge haben (80,81). Man findet noch weitere Austausche, die ebenfalls in abnormalen Hämoglobinen bereits gefunden wurden, z.B. Glu - Ala CD2 (Pos. 43) β in Hb-G-Galveston, die keinerlei pathologische Veränderungen zur Folge haben (65).

Bei den Änderungen an Positionen im Molekülinneren fällt auf, daß diese oft so zueinander plaziert sind, daß eine gegenseitige Beeinflussung leicht vorstellbar ist. Als Beispiel sei hier der Austausch Gly - Ala E18 (74) β und der direkt daneben liegende Austausch Leu - Val E19 (75) β genannt. Bei dem ersten Austausch wird die Seitenkette um eine $-\text{CH}_2$ Gruppe erweitert, bei dem zweiten um eine $-\text{CH}_2$ Gruppe verkürzt. Daraus läßt sich auf eine gegenseitige Kompensation der Austausche schließen.

Strukturbetrachtungen der α^D - Ketten des Feldsperlings

Der Vergleich der α^D -Ketten des Feldsperlings mit den α -Ketten des Humanhämoglobins läßt erkennen, daß wie bereits aus Tabelle VII hervorgeht, alle Häm-Bindungsstellen unverändert erhalten sind.

Mit den Austauschen Ala - Glu B2 (21) α^D und Ala - Val E12 (63) α^D ist eine Berührungsstelle der B und E - Helix verändert. Die ausgetauschten Aminosäuren haben größere Seitenketten. Im Modell des Humanhämoglobins bietet diese Position jedoch für größere Seitenketten keinen Raum. Die Raumstruktur des Hb D des Feldsperlings sollte deshalb in diesem Bereich des Moleküls verändert sein (2).

Ähnliche Verhältnisse wurden bereits bei anderen Vogel-hämoglobinen festgestellt.

Ein Vergleich der α -Ketten der Hämoglobinnebenkomponente (α^D) mit den α -Ketten der Hämoglobinhauptkomponente (α^A) zeigt, daß die Summe der Aminosäureaustausche in der gleichen Größenordnung liegt, wie im Vergleich mit α -Ketten phylogenetisch weit entfernter Säuger.

		Austausche	
Feldsperling	: Feldsperling	$\alpha^A : \alpha^D$	61
"	: Mensch	$\alpha^D : \alpha$	62
"	: Pferd	$\alpha^D : \alpha$	60
"	: Krötenkopf- schildkröte	$\alpha^D : \alpha^D$	50
"	: Zierschild- kröte	$\alpha^D : \alpha^D$	46
"	: Vögel allgem.	$\alpha^D : \alpha^D$	31-36
"	: Star	$\alpha^D : \alpha^D$	8

Die gleichmäßigen Austauschraten zwischen α^A - und α^D - bzw. α^D - und anderen α -Ketten sprechen dafür, daß die Trennung der α -Gene vor der Trennung der Klassen stattgefunden haben dürfte. Die größere Ähnlichkeit der α^D -Ketten der Vögel zu den α^D -Ketten der Schildkröten, als zu den α -Ketten anderer Klassen läßt auf einen näheren Verwandtschaftsgrad zwischen Vögeln und Schildkröten schließen (63).

Strukturbetrachtungen der α^A - Ketten des Feldsperlings

Zwischen den α^A - Ketten des Feldsperlings und den α -Ketten des Humanhämoglobins bestehen 43 Aminosäureaustausche. Davon finden sich 33 an Positionen, an denen bei Vögeln im allgemeinen häufig Austausch vorkommen. 32 der ausgetauschten Aminosäuren liegen an Positionen an der Moleküloberfläche, d.h. dort sollte genug Raum sein, daß eine Veränderung der Seitenketten nicht notwendigerweise eine Veränderung der Raumstruktur des Moleküls nach sich zieht.

Bei den Aminosäureaustauschen an Positionen im Molekülinneren zeigt sich, daß ein Teil der Seitenketten nur sehr geringe Unterschiede aufweist. Bei einem anderen Teil der Austausche ist zu erkennen, daß sie oft so stattgefunden haben, daß neben einer vergrößerten Seitenkette eine verkürzte eingetauscht wurde, so daß sich die Einflüsse der Veränderungen gegenseitig aufzuheben scheinen. Als Beispiele dafür seien hier nur einige dieser Austausche genannt:

Pos 103 α His-Gln (Seitenk.kleiner)

Pos 105 α Leu-Phe (Seitenk. größer)

Pos 108 α Thr-Val (Seitenk. größer)

Pos 109 α Leu-Val (Seitenk. kleiner)

Pos 111 α Ala-Thr (Seitenk. größer)

Pos 112 α His-Gly (Seitenk. kleiner)

Bemerkenswert erscheint der Austausch Ser-Pro H7 (124) α^A . Es ist beschrieben (69), daß Prolin in einem helikalen Bereich nur an den ersten drei oder den drei letzten Positionen eingesetzt ist, da es an Positionen, die weiter innerhalb liegen, die Helix stark verändert ("Helixbrecher").

Die Veränderung kann zur Instabilität des Hämoglobins führen. Als Beispiel dafür seien die abnormalen Hämoglobine "Hb-Quong Sze" (Pro in Position 8 der H-Helix der α -Kette), das eine α -Thalassaemie verursacht (70) und "Hb-Altdorf" genannt (Pro in Position 13 der H-Helix der β -Kette), das zur Hämolyse führt (69) .

Da jedoch in der Funktion des Feldsperlinghämoglobins bisher keine Beeinträchtigungen oder physiologischen Besonderheiten gefunden wurden, wäre denkbar, daß der Austausch von Prolin durch einige der zahlreichen anderen Austausche der α^A - Ketten ausgeglichen wird.

α^A - und α^D - Ketten des Feldsperlings im Vergleich
mit den Ketten anderer Vogelarten

Die Ketten von 10 Vogelarten, deren α^D - Ketten nach-
gewiesen sind, wurden verglichen. (Feldsperling, Star,
Nandu, Steinadler, Moschusente, Spaltfußgans, Strauß,
Kanadagans, Huhn (Leghorn-A), Fasan) (2,45-56) (Tab.VI).

Ergebnisse der Kettenvergleiche:

α^A - Ketten : 86 Positionen konservativ (ohne Austausch)

α^D - Ketten : 86 Positionen konservativ (ohne Austausch)

In α^A - und α^D - Ketten konservativ,

und mit identischen Aminosäuren : 58

Davon mit besonderen Funktionen

im Molekül : 18 Häm-Bindungen
(von 19 möglichen)
14 α_1 - β_2 Bindungen
(von 15 möglichen)
4 α_1 - β_1 Bindungen
(von 16 möglichen)

In α^A - und α^D - Ketten konservativ,

bei 10 Spezies 1 Aminosäureaustausch : 8 Positionen

Davon mit besonderen Funktionen

im Molekül : 1 α_1 - β_2 Bindung
2 α_1 - β_1 Bindungen

Ohne besondere Funktion sind 30 der konservativen Positionen.

Es liegen jedoch davon : 13 direkt neben α_1 - β_1 und
 α_1 - β_2 Bindungen

12 neben Häm-Bindungen

Aus der Auflistung der Vergleiche geht hervor, daß über 60% der Positionen bei den α -Ketten konservativ sind. Von diesen konservativen Positionen besitzen mehr als 67% (41% auf die gesamte Kette bezogen) identische Aminosäuren.

Bei näherer Betrachtung dieser identischen Positionen wird deutlich, daß nahezu alle von Bedeutung für den Molekülaufbau sind und besondere Funktionen erfüllen. Bis auf eine gehören alle Häm-Bindungsstellen und ebenso bis auf eine alle α_1 - β_2 Bindungsstellen dazu. Die Zahl der konservativen Positionen läßt sich noch um 8 erweitern, an denen nur bei einer der 10 Vogelarten ein Austausch auftritt. Davon sind 2 α_1 - β_1 Kontakte, 1 α_1 - β_2 Kontakt. Von den übrigen 30 Positionen liegen 13 direkt neben α_1 - β_1 oder α_1 - β_2 Bindungsstellen und 12 sind Hämbindungsstellen benachbart.

Diese Werte lassen erkennen:

1. Für die Funktion des Moleküls wichtige Positionen und Aminosäuren haben eine sehr geringe Mutationsrate.
2. Die den Häm-Bindungsstellen benachbarten Positionen legen durch ihre konstant niedrigen Mutationsraten die Vermutung nahe, daß sie ebenfalls eine besondere Funktion erfüllen. Denkbar wäre die Unterstützung der Häm-Bindungen.
3. Die α_1 - β_1 Bindungsstellen sind sehr häufig ausgetauscht, was vermuten läßt, daß sie entweder für die Funktion des Moleküls von geringerer Bedeutung sind, oder daß die Vogoglobinketten andere Bindungsstellen als die des menschlichen Hämoglobins besitzen. Es muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, dieses Ergebnis durch physikalisch-chemische Messungen genauer zu klären. Bisher wurde noch von keinem Vogelhämoglobin die Raumstruktur analysiert.

4. Positionen mit hohen Austauschraten

Es fällt auf, daß an bestimmten Positionen sehr häufig Austausche stattfinden. Zum Beispiel im N-terminalen Bereich und in interhelikalen Bereichen der Ketten. In jedem Fall müssen die Austausche an diesen Stellen entweder von nur geringer Bedeutung für die Funktion des Moleküls sein, oder sie bringen dem Individuum bestimmte Vorteile. Es besteht die Möglichkeit, daß einige Austausche neutral sind, d.h. die Aminosäuren unterscheiden sich nur unwesentlich voneinander und nehmen keinen Einfluß auf Struktur und Funktion, oder bestimmte Austausche werden durch andere wieder ausgeglichen.

Verbreitung von α^D - Genen

Die Expression von α^D - Genen ist bisher nur bei Vögeln und Schildkröten beschrieben (68). Die meist zwei Komponenten des adulten Hämoglobins (Hb-A, Hb-D) haben identische β -, aber unterschiedliche α -Ketten. Die α^A - und α^D - Ketten der Vögel unterscheiden sich in ca. 60 Resten voneinander. Die α^D - Ketten wurden erstmals beim Huhn (Leghorn-A) nachgewiesen (71). Chapman fand, daß das embryonale Hb-M α^D - Ketten enthält (72). Da nur ein α^D - Gen gefunden werden konnte, folgert man daraus, daß beide α^D - Ketten gleich sein müssen. α^D - Ketten werden nicht bei allen Vögeln gefunden (73). Die Ursache dafür ist nicht bekannt. Es muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, ob bei adulten Tieren, die keine α^D - Ketten besitzen, kein α^D - Gen vorhanden ist, oder ob es nur nicht exprimiert wird.

Evolution

Vögel werden mit Reptilien und Säugern als Amnionten zusammengefaßt. Die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Amnionten müssen durch Fossildaten und vergleichende Morphologie bestimmt werden. Die unterschiedliche Wertung dieser Daten führt jedoch zu abweichenden Vorstellungen über die Evolution der betreffenden Arten.

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen homologer Proteine läßt Verwandtschaftsbeziehungen der sie codierenden Gene, und damit auch der verschiedenen Tierarten erkennen.

Die großen Übereinstimmungen der Sequenzen des Feldsperlings und des Stars, die bereits aufgezeigt wurden, bestätigen die nahen verwandtschaftlichen Beziehungen, die diesen beiden Vogelarten auch aus anderen Untersuchungen zugeschrieben wurden.

Das Hämoglobin des Araukaner- und des Bankivahuhns

Hühnerhämoglobin war das erste Vogelhämoglobin, dessen Struktur untersucht wurde (Leghorn-A, 54). Die ersten Sequenzdaten ließen noch einige Zweifel offen, konnten aber durch weitere Untersuchungen mit verbesserten Methoden korrekt erhalten werden (53). Die Sequenz der Nukleotide der DNA, die die Globinketten codiert, ist aufgeklärt (55, 56).

Phylognese

Ausgangspunkt für die Untersuchung von Hämoglobinen weiterer Hühnerarten war die Absicht, molekulare Aspekte zur Klärung der stammesgeschichtlichen Entwicklung der Kammhühner beizutragen.

Die Stellung der Hühner im System der Vögel
(nach H.E. Wolters (57))

Ordnung	: Phasianiformes	Hühnervögel
Unterordnung	: Phasiani	Hühner
Familie	: Phasianidae	Hühner
Unterfamilie	: Gallinae	Kammhühner
Gattung	: Gallus	Huhn
Arten	: Gallus gallus	Bankivahuhn
	Gallus sonneratii	Sonnerat-Huhn
	Gallus lafayettii	Lafayette-Huhn
	Gallus varius	Gabelschwanzhuhn

Bei diesen Hühnerarten handelt es sich um die Wildtypen aus denen unsere heutigen Haushühner hervorgegangen sind. Die Wildtypen stammen alle aus dem Bereich Indien und Indonesische-Inseln (3).

Vor allem morphologische Kennzeichen führen zu der in der Literatur häufig vertretenen Annahme, das Bankivahuhn sei der alleinige Stammvater unseres Haushuhns (74,75). Überlieferungen berichten, daß bereits in der Zeit um 2700 - 2500 v.Chr. im Indo-Burmesischen Raum Bankivahühner domestiziert waren. Weitere Zeugnisse belegen, daß um 1500 - 1400 v.Chr. Bankivahühner nach China exportiert worden sind. Aus späteren Berichten geht hervor, daß die Hühner von Vorderasien aus nach Südeuropa gelangten (Griechenland 700 - 600 v.Chr.). Ob das Haushuhn erst mit den europäischen Eroberern nach Amerika gelangte, ist fraglich; zumindest spricht einiges dafür, daß Hühner in dem Teil südlich des Äquators schon früher vorhanden waren (3,82,83).

Das Hämoglobin des Bankivahuhns wurde zur Untersuchung ausgewählt, weil dieses Huhn als sogenanntes "Stammhuhn" gilt. Das Hämoglobin des Araukanerhuhns wurde ausgewählt, weil dieses Huhn einige Besonderheiten aufweist: Es lebt in Südamerika, seine Eischale hat eine blaugrüne Färbung und es zeigt eine außergewöhnliche Höhenfestigkeit. Es reproduziert auch noch in Höhen über 4000 N.N. .

In der vorliegenden Arbeit wurde das Hämoglobin des Araukanerhuhns untersucht. Parallel dazu, gleichsam als Vergleichsstandard, wurde das Hämoglobin des Leghorn-A Huhns bearbeitet, dessen Sequenz bekannt war.

Voruntersuchungen beider adulter Hämoglobine wurden unter identischen Bedingungen durchgeführt. Die Ergebnisse waren identisch. Das Gleiche gilt für die Ketten-trennungen. Nach der Isolierung der Ketten wurden zuerst die α^D - Ketten weiterbearbeitet, da sie bei Vögeln die höchsten Mutationsraten erwarten lassen. Das bedeutet, die Wahrscheinlichkeit zu einem relativ frühen Zeitpunkt der Untersuchungen Austausch zu finden, ist bei den α^D - Ketten am größten.

Nach der Spaltung der Ketten konnten alle tryptischen Peptide isoliert und analysiert werden.

Die Untersuchungen ergaben die völlige Übereinstimmung der Ergebnisse der α^D - Ketten des Leghorn-A - und des Araukanerhuhns.

Auch bei den α^A - Ketten erfolgte die Untersuchung für Araukaner und Leghorn-A -Huhn parallel. Hier wiesen bereits die Elutionsprofile der Trennung der tryptischen Peptide ein so hohes Maß an Übereinstimmung auf, daß keine signifikanten Unterschiede in der Struktur der Ketten zu erwarten waren. Weitere Untersuchungen wurden nicht vorgenommen, da die bis dahin erzielten Ergebnisse keine neuen Erkenntnisse mehr erwarten ließen.

Die Untersuchungen die am Blut des Bankivahuhns durchgeführt wurden, ergaben die völlige Identität mit den als Vergleich parallel dazu angestellten Untersuchungen der Hämoglobine von Leghorn-A - und Araukanerhuhn.

Das Hämoglobin des Bankivahuhns besteht ebenso wie die Hämoglobine der beiden anderen Hühnerformen aus zwei Komponenten, Hb-A (α^A - und β -Ketten) und Hb-D (α^D - und β -Ketten). Bei allen drei Hühnerformen wurde das Blut adulter Tiere untersucht.

Die Wanderungsgeschwindigkeit und die Konzentration der Komponenten aller drei Hämoglobine waren in der Gel-Elektrophorese, unter nativen Bedingungen, völlig identisch. Auch die Untersuchung der Globinketten mittels Triton-Gelelektrophorese ergab völlige Übereinstimmung der Wanderungsgeschwindigkeiten und der Konzentrationsverhältnisse der Ketten aller drei Hämoglobine der adulten Tiere. Diese Ergebnisse ließen weitere Untersuchungen wenig sinnvoll erscheinen, da das hohe Maß an Übereinstimmung zwischen den Hämoglobinen von Bankiva-, Leghorn-A - und Araukanerhuhn keinen Anhaltspunkt für Abweichungen von der Struktur erwarten ließ.

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen der Hämoglobine lassen sich kurz so zusammenfassen : Zwischen den Hämoglobinen von Araukaner-, Bankiva- und Leghorn-A -Huhn konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

Als Folge dieses Ergebnisses stellt sich die Frage nach dem Zeitpunkt, zu dem die Auftrennung dieser Hühnerformen stattgefunden hat. Geht man davon aus, daß die Mutationsrate der Globine bei etwa 6 - 10 Millionen Jahren pro Austausch liegt (76), so läßt sich daraus schließen, daß die Auftrennung dieser Hühnerformen, da keine Mutationen festgestellt werden konnten, erst zu einem jüngeren Zeitpunkt stattgefunden haben muß. Zur Klärung dieser Frage bedarf es weiterer Untersuchungen. Eine geeignete Grundlage dafür könnten Fibrinpeptide bilden, da deren Mutationsrate mit 1 - 2 Millionen Jahren pro Austausch wesentlich höher liegt (78).

Aus dem Ergebnis läßt sich auch feststellen, daß sich die besondere Fähigkeit des Araukanerhuhns in großen Höhen zu leben und sich dort auch zu reproduzieren, nicht in den untersuchten Hämoglobinstrukturen wieder spiegelt. (Im Vergleich dazu kann die " Höhenatmung" der Streifengans einem bestimmten Aminosäureaustausch zugeschrieben werden) (77).

Zur Klärung der besonderen Fähigkeiten des Araukanerhuhns könnten eventuell Untersuchungen der embryonalen Globinketten einen wertvollen Beitrag leisten.

VI. Z U S A M M E N F A S S U N G

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit adulten Vogel-hämoglobinen (HbA u. HbD). Untersucht wurden:

Der Feldsperling (*Passer montanus*, Ordnung Passeriformes)

Das Araukanerhuhn (*Gallus gallus forma araucana*)

Das Bankivahuhn (*Gallus gallus*)

Im Blut adulter Tiere werden 2 Komponenten nachgewiesen: Hb A und Hb D. Die Komponenten unterscheiden sich in den α -Ketten (α^A und α^D) bei identischen β -Ketten. Die Trennung der Ketten erfolgte mittels Chromatographie an CM-Cellulose.

1. Hämoglobine des *Passer montanus*

Die Aminosäuresequenz wurde anhand tryptischer Peptide und Asp-Pro Peptiden aufgeklärt. Die vollständige Sequenz aller drei Ketten (α^A -, α^D - und β -Kette) wird wiedergegeben. Die Beziehung zwischen Struktur und Funktion wird diskutiert. Beachtenswert erscheint die relativ hohe Mutationsrate der α^A -Kette. Ursache dafür könnte das Auftreten eines Prolins im Inneren eines Helixbereiches sein.

2. Hämoglobine des *Gallus gallus, forma araucana*

Die tryptischen Peptide der α -Ketten wurden mittels HPLC isoliert, die Peptide der α^D -Kette wurden analysiert. Der Vergleich mit den homologen Ketten des Leghorn-A Huhns läßt keine Unterschiede erkennen. Die physiologische Besonderheit des Araukanerhuhns in Höhen über 4000 m zu leben und zu reproduzieren spiegelt sich nicht in der Hämoglobinsequenz wieder.

3. Hämoglobine des *Gallus gallus*

Die Bearbeitung des Hämoglobins erfolgte als vergleichende Untersuchung mit den Hämoglobinen des Araukaner- und des Leghorn-A Huhns. Die völlige Identität der Ergebnisse (Wandergeschwindigkeit, Konzentrationen) ergibt keinerlei Hinweise auf Unterschiede zwischen den Sequenzen der Hämoglobine der drei Hühnerformen.

Hemoglobin of adult Birds

Primary Structure of Globin-chains from Tree Sparrow (*Passer montanus*) and Characterization of Hemoglobin from Araucana fowl (*Gallus gallus forma araucana*) and from Red Jungle fowl (*Gallus gallus*).

Summary

The present work deals with bird hemoglobin. The following species were studied:

Tree Sparrow (*Passer montanus*, *Passeriformes*)
Araucana fowl (*Gallus gallus forma araucana*)
Red jungle fowl (*Gallus gallus*)

Blood of the adult birds contains two hemoglobin components, Hb A and Hb D. They differ in the α -chains (α^A, α^D), the β -chains are identical. Chain separation was carried out on CM-Cellulose.

1. Hemoglobins of *Passer montanus*

Amino-acid sequence was studied with tryptic and hydrolytic C-terminal peptides. The complete sequence of all three chains (α^A -, α^D - and β -chain) is presented. The relationship between structure & function is discussed. Of special interest is the relatively high mutation rate of α^A -chain. The reason could be the incorporation of a Proline in the helical region.

2. Hemoglobins of *Gallus gallus, forma araucana*

The tryptic peptides of α -chains were isolated with the help of HPLC, peptides of α^D -chain were analysed. In comparison to Leghorn-A fowl there is no difference between the identical chains. The exceptional ability of the Araucana fowl to live and reproduce at an altitude of more than 4000m is not reflected in the hemoglobin sequence.

3. Hemoglobins of *Gallus gallus*

Hemoglobin of Red Jungle fowl was examined in comparison with hemoglobins of Araucana fowl and Leghorn-A fowl. Results show fully identical structures.

Hemoglobinas de las aves adultas.

Estructura primaria de las cadenas de globinas del gorrión (*Passer montanus*) y caracterización de las hemoglobinas de la gallina araucana (*Gallus gallus* forma araucana) y de la gallina bankiva (*Gallus gallus*)

Resumen

El trabajo presentado se dedica a las hemoglobinas (HbA y HbD) de las siguientes aves:

gorrión (*Passer montanus*)

gallina araucana (*Gallus gallus* forma araucana)

gallina bankiva (*Gallus gallus*)

En la sangre de los animales adultos se encontraron 2 compuestos HbA y HbD. Los compuestos se distinguen en las α -cadenas (α^A y α^D) con β -cadenas idénticas. La división de las cadenas se obtiene por medio de la cromatografía en CM-celulosa.

1. Las hemoglobinas de *Passer montanus*

La secuencia de los aminoácidos fué aclarada por medio de tripsinización. Se demuestra la secuencia completa de las tres cadenas (α^A -, α^D -y β -cadena). Se discuten la relación entre la estructura y su acción. La frecuencia de mutación de la cadena α^A presenta valor excepcional. Se adjudica a ello la presencia de una molecula de prolina en el interior de una helice.

2. Las hemoglobinas de *Gallus gallus* forma araucana

Se aislaron los péptidos de las cadenas por medio de cromatografía líquida a alta presión (HPLC) y se analizaron los péptidos de α^D -cadena. Comparandolas con las cadenas homólogas de la gallina Leghorn-A no se observa ninguna diferencia. La aptitud fisiológica de la gallina araucana par vivir y reproducirse en altura sobre 4000 m s.n.m. no se refleja en la secuencia de la hemoglobina.

3. Las hemoglobinas de Gallus gallus

La preparación de la hemoglobina surgió como investigación comparativa usando las hemoglobinas de la gallina araucana y de la gallina Leghorn-A. La completa identidad de los resultados (velocidad cromatográfica y concentraciones) no indica diferencia entre las secuencias de las hemoglobinas.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Dayhoff, M.O., Atlas of Protein Sequence and Structure; (1978) National Biomedical Research Foundation, Silver-spring.
- (2) Oberthür, W. & Braunitzer, G. (1984) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 365, 159-173. Hämoglobine vom Gemeinen Star (*Sturnus vulgaris*, Passeriformes)
- (3) Scholtyssek, S. & Doll, P. (1978) Nutz- und Ziergeflügel; Verlag Ulmer, Stuttgart, 250-300.
- (4) Ryle, A.P.; Sanger, F. & Smith, L.F. (1955) Biochem. J. 60, 541-556. The Structure of Insulin.
- (5) Braunitzer, G., Gehring-Müller, R., Hilschmann, N., Hilse, K., Hobom, G., Rudloff, V. & Wittmann-Liebold, B. (1961) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 325, 283-286. Die Konstitution des normalen adulten Humanhämoglobins.
- (6) Kendrew, J.C. (1961) Sci. Am. 205, 104. The Three Dimensional Structure of a Protein Molecule.
- (7) Perutz, M.F., Rossmann, M.G., Cullis, A.F., Muirhead, H., Will, G. & Worth, A.C.T. (1960) Nature (London) 185, 416. Structure of Haemoglobin.
- (8) Edman, P. & Begg, G. (1967) Eur. J. Biochem. 1, 80-91. A Protein Sequenator.
- (9) Braunitzer, G., Chen, R. et al. (1972) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 832. Automatische Sequenzanalyse eines Proteins. (β -Lactoglobulin A B).
- (10) Perutz, M.F. (1983) Mol. Biol. Evol. 1, 1-28. Species Adaption in a Protein Molecule.

- (11) Fermi, G. & Perutz, M.F. (1981) Claredon Press, Oxford, Atlas of Molecular Structures in Biology, 2, Hemoglobin and Myoglobin.
- (12) Chanutin, A. & Curnish, R.R. (1967) Arch. Biochem. Biophys. 121, 96-102. Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes.
- (13) Benesch, R. & Benesch, R.A. (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun. 26, 162-167. The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin.
- (14) Kilmartin, J. (1976) Br. Med. Bull. 32, 209-212. Interaction of Hemoglobin with Protons, CO₂ and 2,3-Di-phosphoglycerate.
- (15) Bunn, Forget, Ronney (1977) Human Hemoglobins, 64-70. W.B. Saunders Comp., Philad./London/Toronto.
- (16) Borgese, F.A. & Nagel, R.L. (1977) Comp. Biochem. Physiol. 56A, 539-543. Different Effect of 2,3-DPG, ATP and IPP on Oxygen Equilibria of Duck embryonic, fetal and adult Hemoglobins.
- (17) Rappoport, S. & Guest, G.M. (1941) J. Biol. Chem. 138, 269. Distribution of Acid-soluble Phosphorus in Blood cells of various Vertebrates.
- (18) Bartlett, G.R. (1976) Comp. Biochem. Physiol. 55A, 211-214. Phosphat compounds in Redcells of Reptiles, Amphibians and Fish.
- (19) Isaacks, R.E., Harkness, D.R., Adler, J.L. & Goldman, P.H. (1976) Arch. Biochem. Biophys. 173, 114-120. Studies on Avian Erythrocyte Metabolism.

- (20) Bartlett, G.R. & Borgese, T.A. (1976) *Comp. Biochem. Physiol.* 55A, 207-210. Phosphate Compounds in Redcells of Chicken and Duck Embryo and Hatching.
- (21) Braunitzer, G. (1967) *Jahrbuch der Max-Planck-Ges. z. Förder. d. Wissensch.; Molekularbiologie und Evolution*, 80.
- (22) Czelusniak, J., Goodman, M., Hewett-Emett, D., Weiss, M.L., Venta, P.J. & Tashian, R.E. (1982) *Nature* 298, 279-300. Phylogenetic origins and adaptiv evolution of avian and mammalian hemoglobin genes.
- (23) Zuckerkandl, E. & Schroeder, W.A. (1961) *Nature* 192, 984-985. Amino-acid Composition of the Polypeptide chains of Gorilla Haemoglobin.
- (24) Rifkin, D.B. & Koenigsberg, W. (1965) *Biochem. Biophys. Acta* 104, 457-461. Hemoglobin of Chimpanzee (*Pan troglodytes*)
- (25) Matsuda, G., Maita, F., Braunitzer, G. & Schrank, B. (1980) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 361, 1107-1116. Notiz zur Sequenz der Hämoglobine der Pferde.
- (26) Fitch, W. & Margoliash, E. (1967) *Science* 155, 279-284. Construction of phylogenetic trees.
- (27) Braunitzer, G. (1972) *Scientia* 107, 189. Evolution der Moleküle.
- (28) Goodman, M. (1982) Plenum Press, N.Y. and London; *Macromolecular Sequences in Systematics and Evolutionary Biology*.
- (29) Shoshani, J., Goodman, M., Czelusniak, J. & Braunitzer, G. (1984) Preliminary manuscript for Nato Rodent Phylogeny Symposium. Pers. Mitteil.

- (30) Ingram, V.M. (1957) Nature 180, 326-328. Gene mutation in human hemoglobin.
- (31) Schmidt, R.M., (1975) Abnormal hemoglobins and Thalassaemia; Academic Press, N.Y.-San Francisco-London.
- (32) Braunitzer, G., Schrank, B., Stangl, A. & Bauer, C. (1978) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 547-558. Phosphat-Protein Wechselwirkung und die Atmung des Lamas, des menschlichen Fötus und die des Pferdes.
- (33) Braunitzer, G., Schrank, B. & Wiesner, A. (1979) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1941-1946. Die Sequenz der Hämoglobine des Dromedars.
- (34) Dodgson, J.B., Mc Cune, K.C., Rushing, D.J., Krust, A. & Engel, J.D. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 5998-6002. Adult chicken α -globin genes, α^A and α^D . No anemic shock α -globin exists in domestic chickens.
- (35) Villeponteau, B., Landes, G.M., Pankratz, M.J. & Martinson, H.G. (1982) J. Biol. Chem. 257, 11015-11023. The chicken β -globin gene region.
- (36) Edman, P. (1956) Acta Chem. Scand. 10, 761. On the Mechanism of the Phenyl Isothiocyanate Degradation of Peptides.
- (37) Hirs, C.H.W. (1967) Meth. Enzymol. 11, 218.
- (38) Gross, E. (1961) J. Am. Chem. Soc. 83, 1510-1511. Selective Cleavage of the Methionyl Peptid Bonds in Ribonuclease with Cyanogen Bromide.
- (39) Kratzin, H., Yang, C., Krusche, J.U. & Hilschmann, N. (1980) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 1591-1598. Präparative Auftrennung des tryptischen Hydrolysates eines Proteins mit Hilfe der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie.

- (40) Rattenbury, J.M. (1981) Ellis Harwood Ltd., Cichester; Amino-Acid Analysis.
- (41) Rossi-Fanelli, A., & Antonini, E. (1958) Biochim. Biophys. Acta 30, 608-612. Studies on the Structure of Hemoglobin.
- (42) Davis, B.J. (1964) Am. N.Y. Acad. Sci. 121, 404-427. Disk-Elektrophoresis-II. Method and Application to Human Serum Proteins.
- (43) Rovera, G., Magarian, C. & Borun, T.W. (1978). Anal. Biochem. 85, 506-518. Resolution of Hemoglobin Subunits by Electrophoresis in Acid Urea Polyacrylamide Gels Containing Triton X-100.
- (44) Braunitzer, G., Schrank, B., Ruhfus, A., Petersen, S. & Petersen, U. (1971) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 1730-1732. Zur vollständigen automatischen Sequenzanalyse von Peptiden mit Quadrol.
- (45) Oberthür, W. & Braunitzer, G. (1981) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 1101-1112. Untersuchungen am Hämoglobin der Graugans (Anser anser).
- (46) Braunitzer, G. & Godovac, J. (1982) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 229-238. The Amino-acid Sequence of Pheasant (Phasianus colchicus colchicus) Hemoglobins.
- (47) Niessing, J. (1981) Biochem. Intern. 2, 113-120. Molecular Cloning and Nucleotide Sequence Analysis of Adult Duck β -Globin cDNA.
- (48) Erbil, C. & Niessing, J. (1982) Gene 200, 211-217. The complete nucleotide sequence of the duck α^A -globin gene.

- (49) Erbil, C. & Niessing, J. (1983) The EMBO J. 2, No.8, 1339-1343. The Primary Structure of the Duck α^D -Globin Gene.
- (50) Godovac-Zimmermann, J. & Braunitzer, G. (1984) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 365, 437-443. The Amino-acid Sequence of α^A - and β -chains from the Major Hemoglobin Component of American Flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*).
- (51) Oberthür, W., Braunitzer, G., Grimm, F. & Kösters, J. (1983) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 851-858. Hämoglobine des Steinadlers (*Aquila chrysaetos*, *Accipitriformes*) Die Aminosäuresequenz der α^A - und β -Ketten der Hauptkomponente.
- (52) Oberthür, W., Braunitzer, G., Baumann, R. & Wright, P.G. (1983) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 119-134. Die Primärstruktur der α - und β -Ketten der Hauptkomponenten der Hämoglobine des Straußes (*Struthio camelus*) und des Nandus (*Rhea americana*) (*Struthioformes*).
- (53) Knöchel, W., Wittig, B., Wittig, S., Malyacal, E.J., Grundmann, U., Oberthür, W., Godovac, J. & Braunitzer, G. (1982) Nature 295, 710-712. No evidence for "stress" α -globin genes in chicken.
- (54) Matsuda, G., Takei, H., Wu, K.T. & Shiazawa, T. (1971) Int. J. Prot. Res. 3, 173. Sequence studies on the tryptic peptides and chymotryptic peptides from the α -polypeptid chain of AII component of the chicken Hemoglobin.
- (55) Dodgson, J.B. & Engel, J.D. (1983) J. Biol. Chem. 258, 4623-4629. The Nucleotide Sequence of the Adult Chicken α -Globin Genes.

- (56) Dolan, M., Sugarman, B.J., Dodgson, J.B. & Engel, J.D. (1981) Cell 24, 669-677. Chromosomal Arrangement of the Chicken β -Type Globin Genes.
- (57) Wolters, H.E. (1975-1982) Verlag Paul Parey, Berlin-Hamburg; Die Vogelarten der Erde.
- (58) Wolters, H.E. (1977) Grzimeks Tierleben, Enzyklopädie des Tierreiches, Bd.9, Vögel III, 405-412.
- (59) Arnone, A. & Perutz, M.F. (1974) Nature (London) 249, 34-36. Structure of inositol hexaphosphate- human desoxyhaemoglobin complex.
- (60) Bland, D.K. & Holland, R.A.B. (1977) Respir. Physiol. 31, 279-290. Oxygen affinity and 2,3-Diphosphoglycerate in blood of Australian Marsupials of differing bodysize.
- (61) Lutz, P.L., Longmuir, I.S. & Schmidt-Nielsen, K. (1974) Respir. Physiol. 20, 325-330. Oxygen Affinity of Bird Blood.
- (62) Kurachi, S., Hermondsen, M., Hornung, S. & Stamatoyannopoulos, G. (1973) Nature New Biol. 243, 275-276. Structure of Haemoglobin Seattle.
- (63) Aschauer, H., Sanguanserm Sri, T. & Braunitzer, G. (1981) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 1159-1162. Embryonale Hämoglobine des Menschen : Die Primärstruktur der ζ -Ketten.
- (64) Chapman, B.S., Tobin, A.J. & Hood, L.E. (1980) J. Biol. Chem. 255, 9051-9059. Complete Amino-Acid Sequences of the Major Early Embryonic α -Like Globins of the Chicken.

- (65) Bowman, B.H., Oliver, C.P., Barnett, D.R., Cunningham, J.E. & Schneider, R.G. (1964) *Blood* 23, 193-199. Chemical Characterisation of Three Hemoglobins-G.
- (66) Fermi, G., Perutz, M.F., Shaanan, B. & Fourme, R. (1984) *J. Mol. Biol.* 175, 159-174. The Crystal Structure of Human Deoxyhaemoglobin at 1,74 Å Resolution.
- (67) Steigemann, W. & Weber, E. (1979) *J. Mol. Biol.* 127, Structure of Erythrocyruorin in different ligand states refined at 1,4 Å resolution.
- (68) Rücknagel, K.P., Reischl, E. & Braunitzer, G. (1984) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 365, 1136-1171. Expression von α^D -Genen bei Schildkröten.
- (69) Marti, H.R., Winterhalter, K.H., DI Iorio, E.E., Lorkin, P.A. & Lehmann, H. (1976) *Febs Letters* 63, 193-196. Hb-Altdorf $\alpha_2 \beta_2$ 135 H13 Ala-Pro.
- (70) Goosens, M., Lee, K.Y., Liebhaber, S.A. & Kan, Y.W. (1982) *Nature* 296, 864-865. Globin structural mutant α 125 Leu-Pro is a novel cause of α -thalassaemia.
- (71) Matsuda, G., Takei, H, Wu, K.C., Shiazawa, T. & Ota, Y. (1972) *Int. J. Pept. and Prot. Res.* 4, 291-302. Sequence studies on the tryptic peptides and the chymotryptic peptides from the α -polypeptidchain of AII component of the chicken Hemoglobin.
- (72) Chapman, B.S., Tobin, A.J., Hood, L.E. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 651-658. Minor early embryonic chicken Hemoglobin M.

- (73) Godovac-Zimmermann, J. & Braunitzer, G. (1984)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 365, 1107-1113.
Hemoglobin of the Adult White Stork (*Ciconia ciconia*,
Ciconiiformes).
- (74) Gandert, O.F. (1953) Beiträge zur Frühgeschichte der
Landwirtschaft, I, 69-81. zur Abstammungs und Kulturgeschich-
te des Hausgeflügels, insbesondere des Haushuhnes.
- (75) Herre, W., (1955) G. Heberer, Evolution der Organis-
men, Stuttgart 801-856. Domestikation und Stammes-
geschichte.
- (76) Zuckerkandl, E. & Pauling, L. (1962) Acad. Press New
York. Horizons in Biochemistry.
- (77) Oberthür, W., Voelter, W. & Braunitzer, G. (1980)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 969-975.
Die Sequenz der Hämoglobine der Streifengans
(*Anser indicus*) und Strauß (*Struthio camelus*).
- (78) Dickerson, R.E. & Geis, I. (1971) Verlag Chemie,
Weinheim. Struktur und Funktion der Proteine, 66
Die Uhren der Evolution.
- (79) Perutz, M.F., Muirhead, H., Cose, J.M. & Godman, L.C.D.
(1968) Nature 219, 131-139. Synthesis of Horse Oxy-
hämoglobin at 2,8 Å Resolution. The Atomic Model.
- (80) Tatsis, B., Sofroniadou, K. & Stergiopoulos, C.I.
(1976) Blood 47, 827-832. Hb-Pyrgos: A new hemoglobin
variant in double heterozygosity with Hb S.
- (81) Imamura, T., Fujita, S., Ohta, Y., Hanada, M. & Yanase,
T. (1969) J. Clin. Invest. 48, 2341-2348. Hb Yashizuka
A new variant with a reduced oxygen affinity from a
Japanese family.

- (82) Lindner, H. (1979) Dissertation med.vet. München.
Zur Frühgeschichte des Haushuhns im Vorderen Orient.
- (83) Thesing, R. (1977) Dissertation med.vet. München.
Die Größenentwicklung des Haushuhns in vor- und
frühgeschichtlicher Zeit.

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. G. Braunitzer am Max-Planck-Institut für Biochemie von Juli 1983 bis März 1985 durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. J. Kösters möchte ich für die Anregung zu dieser Arbeit und die Bereitstellung des Vogelblutes danken, Herrn Prof. Dr. G. Braunitzer für großzügige Unterstützung, Förderung und sehr gute Arbeitsbedingungen.

Ferner gilt mein Dank Herrn Dr. W. Oberthür, der mich in spezielle Methoden der Proteinchemie einführte und durch fruchtbare Diskussion und Anregungen unterstützt hat.

Bei allen Mitarbeitern der Abteilung Proteinchemie und des Instituts für Geflügelkrankheiten möchte ich mich für ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bedanken.

Für die Durchführung der Aminosäureanalysen danke ich Herrn A. Stangl und Fräulein E. Müller, für die zuverlässige Arbeit am Sequencer Frau B. Schrank, Frl. R. Gautsch und Herrn C. Krombach.

Der Max-Planck-Gesellschaft danke ich für die Gewährung eines Promotionsstipendiums.

Lebenslauf

Dirk Schneeganß

6. 10. 1952 geboren als Sohn der Eheleute
Dr. med. Ludwig Schneeganß und dessen
Frau Dr. med Ingeborg Schneeganß (geb.
Schmidt) in Bad Dürkheim/Weinstraße
5. 9. 1980 Eheschließung mit der Lehrerin Alexa
Speck aus Bad Dürkheim

Ausbildung

- 1959 - 1963 Volksschule, Bad Dürkheim
- 1963 - 1972 Neusprachliches Gymnasium, Bad Dürkheim
- Mai 1972 hier Abitur
- Winter 1972 Beginn des Jura-Studiums an der
Universität Mannheim
- Winter 1977 Studium der Veterinärmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München
- Mai 1983 Staatsexamen
- Seit Juli 1983 Arbeit an vorliegender Dissertation am
Max-Planck-Institut für Biochemie in
Martinsried bei München, Abt. Protein-
chemie, Prof. Dr. G. Braunitzer.

